Miscellaneous Special Publication 31 (Revised)

Fish Health Protection Regulations

Manual of Compliance

Fisheries and Oceans
Pêches et Océans

Canada

/ 84- 4074 /

MISCELLANEOUS SPECIAL PUBLICATION 31 (REVISED)

Fish Health Protection Regulations Manual of Compliance

Department of Fisheries and Oceans
Fisheries Research Directorate
Aquaculture and Resource Development Branch
Ottawa, Ontario K1A 0E6

Ottawa 1984

©Minister of Supply and Services Canada 1984

Cat. No. Fs 41-31/31-1984
ISBN 0-662-53060-8

Available free from:

Department of Fisheries and Oceans
Fisheries Research Directorate
Aquaculture and Resource Development Branch
Ottawa, Ontario K1A 0E6

Published by

Fisheries
and Oceans

Scientific Information
and Publications Branch

Publié par

Pêches
et Océans

Direction de l'information
et des publications scientifiques

Ottawa K1A 0E6

Correct citation for this publication:

Department of Fisheries and Oceans. 1984. Fish Health Protection Regulations: manual of compliance. Fish. Mar. Serv. Misc. Spec. Publ. 31 (Revised): 43 p.

CONTENTS

		Page
	ABSTRACT	iv
I	INTRODUCTION	1
II	REGULATIONS RESPECTING THE PROTECTION OF HEALTH OF FISH	3
III	GUIDELINES FOR PRODUCERS	6
IV	ROLE OF FISH HEALTH OFFICIALS	9
V	ROLE OF LOCAL FISH HEALTH OFFICERS	11
VI	SAMPLING PROCEDURES	12
VII	TRANSPORTATION OF SAMPLES	16
VIII	TREATMENT OF SAMPLES	17
IX	PROCEDURES FOR THE DETECTION OF CERTAIN BACTERIAL FISH PATHOGENS	18
X	PROCEDURES FOR THE DETECTION OF VIRUSES	24
XI	PROCEDURES FOR THE DETECTION OF CERTAIN PARASITES	28
XII	EGG DISINFECTION PROCEDURES	31
	REFERENCES	33
APPENDIX 1	NATIONAL REGISTRY OF FISH DISEASES	35
APPENDIX 2	REGIONAL ADMINISTRATIVE AUTHORITIES	36
APPENDIX 3	QUALIFICATIONS OF FISH HEALTH OFFICIALS	39
APPENDIX 4	FISH HEALTH CERTIFICATE	40
APPENDIX 5	FISH HEALTH LABORATORY REPORT	42

ABSTRACT

Department of Fisheries and Oceans. 1984. Fish Health Protection Regulations: manual of compliance. Fish. Mar. Serv. Misc. Spec. Publ. 31 (Revised): 43 p.

This revised manual explains the application of the Fish Health Protection Regulations under the Fisheries Act of Canada. It outlines the administrative and inspection procedures to be followed and provides step-by-step procedures for handling fish samples to test for the major bacterial, viral, and myxosporean pathogens of salmonids.

All movements of fish into Canada or between provinces require a permit. This permit will be issued only to producers whose facilities have been inspected and certified free of designated disease agents.

The sampling procedures are based on the probability of detecting an infected specimen in a lot, assuming a certain prevalence of detectable infection. Selection, transportation, and laboratory handling of the samples are described in detail.

The methods provide for the detection of the following pathogens: the kidney disease bacterium (Renibacterium salmoninarum); the redmouth bacterium (Yersinia ruckeri); the furunculosis bacterium (Aeromonas salmonicida); the protozoans causing whirling disease (Myxosoma cerebralis) and ceratomyxosis (Ceratomyxa shasta); the viruses causing viral hemorrhagic septicemia, infectious hematopoietic necrosis, and infectious pancreatic necrosis; and other pathogens considered to be notifiable.

I INTRODUCTION

The future of Canadian fish culture and of recreational and commercial fisheries depends upon healthy fish stocks. International and interprovincial exchange of cultivated species is increasing rapidly, facilitating the dissemination of serious infectious diseases, for example the spread of whirling disease in North America. Effective programs of prevention and control are necessary to prevent spread of fish disease agents and to alleviate this serious impediment to development of these fisheries. This revised manual of compliance was prepared to explain the application of the Fish Health Protection Regulations under the Fisheries Act of Canada. It presents guidelines for producers, defines the roles of Fish Health Officials and Local Fish Health Officers, and outlines the sampling, handling, and diagnostic procedures that constitute inspections leading to certification.

The Fish Health Protection Regulations as published in the Canada Gazette appear in Section II. They apply to all fish species belonging to the family Salmonidae of the genera listed in Schedule I. The Regulations are designed to prevent the spread of infectious diseases through inspection of production facilities' fish stocks, and to control the movement of infected fish. They apply to live and dead cultured fish, eggs (including any fertilized or unfertilized sex products) of cultured and wild fish and products of dead cultured fish (including cold smoked products, but not heat processed canned products) destined to move into Canada or across provincial boundaries within Canada. In the event of violation of these Regulations, seizure and other powers of the Fisheries Act apply.

Compliance with these Regulations requires that four consecutive satisfactory inspections over a period of not less than 18 months must be conducted at a facility prior to certification. Inspections must be conducted at intervals of not less than 90 days and not more than 270 days during the pre-certification period. A new facility using an isolated water supply free of all species of fish, starting with stocks from a certified facility, can gain certified status after only one satisfactory inspection. For a production facility to retain certified status, consecutive satisfactory inspections must be conducted twice yearly at approximately 6-month intervals (not less than 90 days nor more than 270 days). Inspections should be made during the spring and fall periods, with the final inspection having been made not more than 270 days prior to date of entry of a shipment of fish into a province. Procedures outlined in this manual are to be followed.

The concept of "zoning" may be introduced on the basis of detailed information relating to the absence of disease agents in specific areas. Recognition of specific pathogen free "zones" could lead to modification of inspection requirements in production facilities. The zoning concept will only be applied to facilities exporting dead cultured fish.

If further clarification on the interpretation of these regulations is required, contact the National Registry of Fish Diseases, Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, Ontario K1A 0E6, telephone (613) [redacted] or telex 0534228.

990-0276

II REGULATIONS RESPECTING THE PROTECTION OF HEALTH OF FISH

Short Title

1. These Regulations may be cited as the Fish Health Protection Regulations.

Interpretation

2. In these Regulations,

"approved" means approved by the Minister; (approuvé)
"certificate" means a certificate issued in accordance with section 6; (certificat)
"cultured fish" means a fish listed in Schedule I that is propagated by man in a fish culture facility and includes the eggs of such fish; (poisson d'élevage)
"fish health official" means a person approved to inspect fish and fish sources for the purposes of these Regulations; (inspecteur sanitaire des poissons)
"import" means to bring into any province of Canada from any other country or any other province of Canada; (importer)
"import permit" means a permit issued pursuant to section 4; (licence d'importateur)
"local fish health officer" means a person approved as a local fish health officer in charge of the administration and enforcement of these Regulations; (agent local de protection de la santé du poisson)
"Minister" means the Minister of Fisheries for Canada; (Ministre)
"wild fish" means a fish listed in Schedule I, other than a fish propagated by man in a fish culture facility. (poisson sauvage)

Prohibition

3. No person shall import cultured fish or eggs of wild fish without an import permit.

Permits

4. Subject to section 5, a local fish health officer for a province may issue an import permit to a person who applies therefor authorizing him to import cultured fish or eggs of wild fish into that province.

5. No import permit shall be issued unless

(a) the person who applies for the permit has obtained a certificate; and
(b) the local fish health officer is satisfied that any disease or disease agent listed in Schedule IV indicated on the

certificate pursuant to subsection 6(2) will not be harmful to the protection or conservation of fish in the province of importation.

Certificates

6. (1) A certificate required by paragraph 5 (a) shall be issued by a fish health official certifying in respect of

(a) live cultured fish that
  (i) the fish come from a source that was inspected in an approved manner and found to be free of any disease or disease agent listed in Schedule II, and
  (ii) no fish, other than a fish from a source referred to in subparagraph (i), has been introduced to the source of importation within the two years immediately preceding the date of certification;
(b) eggs of wild fish, that the eggs were taken from wild fish that were inspected in an approved manner and found to be free of any disease or disease agent listed in Schedule II; or
(c) dead cultured fish, that the fish come from a source that was inspected in an approved manner and found to be free of any disease or disease agent listed in Schedule III.

(2) A certificate referred to in paragraph (1)(a), in respect of a live cultured fish, or paragraph (1)(b) in respect of eggs of wild fish, shall have indicated thereon the presence of any disease or disease agent listed in Schedule IV that has been detected in the fish during the inspection referred to in that paragraph.

SCHEDULE I

FISH

All species and hybrids derived from species of fish belonging to the family Salmonidae, including the following genera:

Pacific salmon	Oncorhynchus spp.
Danube salmon and Taimens	Hucho spp.
Atlantic salmon	Salmo spp.
Trout	Salmo spp.
Char	Salvelinus spp.
Grayling	Thymallus spp.
Lenok	Brachymystax spp.
Inconnu	Stenodus spp.
Whitefish	Coregonus spp.
Whitefish	Prosopium spp.
Ayu	Plecoglossus spp.

SCHEDULE II

DISEASES OR DISEASE AGENTS FOUND IN LIVE FISH OR THEIR SOURCE

1. Any filterable replicating agent capable of causing cytopathic effects in the cell lines of fish specified by the Minister, including but not limited to
   (a) Viral Hemorrhagic Septicemia (Egtved) (Egtved virus, VHSV)
   (b) Infectious Hematopoietic Necrosis (IHNV)
   (c) Infectious Pancreatic Necrosis (IPNV)
2. Whirling Disease (*Myxosoma cerebralis*)
3. Ceratomyxosis (*Ceratomyxa shasta*)
4. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*)
5. Bacterial Kidney Disease (KD bacterium)
6. Enteric Redmouth Disease (RM bacterium)

SCHEDULE III

DISEASES OR DISEASE AGENTS FOUND IN DEAD FISH OR THEIR SOURCE

1. Viral Hemorrhagic Septicemia (Egtved) (Egtved virus, VHSV)
2. Whirling Disease (*Myxosoma cerebralis*)

SCHEDULE IV

DISEASES OR DISEASE AGENTS FOUND IN LIVE FISH OR THEIR SOURCE

1. Myxobacterial infections
2. Motile Aeromonad Septicemia (motile *Aeromonas* sp.)
3. Pseudomonad Septicemia (*Pseudomonas* spp.)
4. Vibriosis (*Vibrio* spp.)

III GUIDELINES FOR PRODUCERS

The Regulations apply to all facilities from which live and dead cultured fish, eggs of cultured and wild fish, and products of dead cultured fish (including cold smoked products but not heat processed canned products) of all species belonging to the family Salmonidae, as designated in Schedule I, which will be shipped into Canada or from one province to another. "Facilities" include all sites used for the propagation or holding of eggs and/or fish.

An import permit is required for each shipment of fish or eggs designated above, except for interprovincial shipments of dead cultured fish in Canada. These permits may be issued only to those producers providing appropriate evidence that the health status of their facility has been certified through inspection of their fish stocks by an approved Fish Health Official. Producers should become familiarized with all of the regulations of the region into which they plan to import fish since requirements may exist in addition to the Fish Health Protection Regulations.

A list of Fish Health Officials approved for the certification of facilities may be obtained from the National Registry of Fish Diseases, Department of Fisheries and Oceans; however, Canadian producers should request certification directly from the authority under which they are licenced to operate.

Within Canada, a producer wishing to obtain certification for his/her production facility is expected to provide fish at his/her own expense for inspection. Fish species, other than those listed in Schedule I, that the producer is rearing at his/her facility are also subject to sampling by the Fish Health Official. The Department of Fisheries and Oceans will assume the costs of such inspections within Canada, only as they relate to commercial operators who ship fish outside the province in which they are licenced. Outside Canada, the producer must obtain certification at his/her own expense using Fish Health Officials approved by the Minister. The Fish Health Official has flexibility in establishing time and frequency of sampling and selection of fish and must have access to records relating to introductions, losses, disease prevalence and treatments.

If a production facility which is certified receives fish or eggs from an uncertified source including species not listed in Schedule I, or if any disease specified in Schedule II in the Regulations is found in the facility, it is subject to de-certification and a 2-year re-inspection program prior to re-certification. Before commencing a re-certification program, the producer must demonstrate that he/she has undertaken adequate measures to eliminate actual or potential disease problems. If a certified facility receives fish or eggs from another certified source, the certification status is unaffected, but that producer must be prepared to provide a record of such introductions upon request. A new production facility located on an isolated water supply free of all species of fish may be certified after only one satisfactory inspection if the stock(s) in that facility was obtained from another certified facility. After this first inspection, maintenance of certification status will depend on continuing

satisfactory inspections similar to that required by all other facilities.

Before shipment, an import permit must be obtained from the Local Fish Health Officer of the province to which the shipment is going. Import permits must accompany all shipments of fish. Offices at which the Local Fish Health Officers can be reached are listed in Appendix 2.

To acquire an import permit, producers must provide a signed copy of their Fish Health Certificate (Appendix 4) attesting that no fish, other than those from certified facilities or certified wild stocks, including species not listed in Schedule I, have been introduced into their facilities during the period of certified status. When an application for an import permit is made, the producer must also declare that no certifiable disease agent has been found at the facility since the last inspection.

An import permit allows the transport of fish from the certified source facility directly to the receiving facility. The replenishing of water in a truck or other shipment container at any location other than a certified facility or an isolated water source free of all species of fish is the same as an introduction of fish from an uncertified source into a facility, and invalidates the import permit.

Although not specified in the Regulations, surface disinfection of eggs prior to shipment is strongly recommended unless otherwise advised. A suggested procedure for disinfection is given in Section XII of this manual.

Specialized producers may need clarification on some topics. Shipments of fish distributed dead from landlocked lakes and prairie lakes (potholes) that regularly undergo winter kill are a special case: they may be shipped without inspection if (a) the lakes were stocked from a certified source, (b) no overt infectious disease has occurred during the growing period, and (c) the lakes have no history of contamination with the certifiable disease agents listed in Schedule III. If all of the foregoing conditions cannot be met, the lakes must be certified as being free of the disease agents listed in Schedule III before shipments of dead fish may be made. If live fish are to be shipped, the lakes must be certified as being free of the disease agents listed in Schedule II. Certification must be based on the outcome of inspections of fish produced in the lakes conducted at, or about, the time of fish harvesting.

A Fish Health Official may wish to alter inspection procedures under certain circumstances. A prior ruling on these alterations can be obtained from the National Registry of Fish Diseases.

A fish health diagnostic laboratory may be located in a different province from that in which an inspection is being conducted, requiring the transport of fish samples across provincial boundaries.

Such samples should be handled so as to avoid any transfer of disease. All persons involved in fisheries research must conform to the requirements and intent of the Regulations and be cognizant of regional conditions.

IV ROLE OF FISH HEALTH OFFICIALS

The Fish Health Official must be a qualified specialist in fish disease diagnosis, have access to a laboratory equipped to undertake the diagnostic procedures outlined in this manual, and have received approval from the Government of Canada (Appendix 3). Those seeking approval are to contact the National Registry of Fish Diseases, providing a copy of their curriculum vitae, three specimens of their signature, and an outline of their laboratory capabilities. All applications will be screened by a panel of disease specialists, and applicants will be advised as to the outcome of their application. Evidence that an approved Fish Health Official is not following the intent of the Regulations, i.e. to prevent the spread of infectious disease agents by careful inspection of production sources and control of infected stock movements, by wilfully disregarding either inspection requirements and/or results of inspections, will lead to suspension or removal from the approved list.

The Fish Health Official conducts an inspection by visiting the production site, viewing all parts of the site, and carrying out the procedures outlined in Sections VI-XI of this manual. The Official should obtain information from the owner or manager of the site on identification of stocks being inspected and familiarize himself/herself with records of introductions, losses, disease prevalence and treatment of fish in the facility over the past two years, or from the date of initial certification. If all requirements of the Regulations are met and if the inspection schedules outlined earlier have been adhered to, the Fish Health Official may issue a Fish Health Certificate (Appendix 4), which must be distributed as follows:

White copy - to owner/manager, a copy of which will accompany each application for an import permit
Yellow copy - to National Registry of Fish Diseases
Pink copy - to Fish Health Official for file use

If Fish Health Officials have diagnostic information which they have gathered from sampling outside of the designated spring-fall sampling periods, or documented diagnostic information from other reliable sources, this information is to be used in determining certification status along with that collected during the designated periods.

In addition, Fish Health Officials in Canada are required to complete a Fish Health Laboratory Report (Appendix 5) in triplicate, sending the yellow copy to the National Registry of Fish Diseases, the white copy to owner/manager to provide evidence of the inspection, and retaining the pink copy for the files of the Fish Health Official. Fish Health Laboratory Reports of facilities outside Canada do not have to be filed with the Registry, although the laboratory results leading to certification of a facility may be required by the purchaser.

If de-certification of a facility is necessary because of failure to meet the various requirements of the inspection, either through detection of Schedule II pathogens or through introduction of stocks from a non-certified source, then the following procedures are to be carried out by the Fish Health Official: copies of the completed Fish Health Laboratory Report and a letter outlining the reason(s) for de-certification and the steps necessary to regain certification are to be sent to the producer and the National Registry of Fish Diseases.

The minimal steps necessary to regain certification of a facility are as follows:

a) All lots in which a Schedule II disease agent was detected must be removed from the facility.
b) The rearing units from which these lots were removed must be treated using recognized procedures to eliminate disease agents.
c) The facility must undergo four consecutive satisfactory inspections over a period of not less than 18 months, with intervals of not less than 90 days and not more than 270 days between inspections.

V ROLE OF LOCAL FISH HEALTH OFFICERS

Local Fish Health Officers, located within each region of Canada, administer these Regulations for their province or area. Their responsibilities include a review of certificates and data relevant to a production source in question, a shipment of fish or eggs in particular, and the health needs of their region. Subsequent to Section 5 of the Regulations, they may issue import permits to applicants to allow passage of acceptable shipments of live fish or eggs entering Canada or moving interprovincially within Canada and dead fish entering Canada at border points. Permits must accompany each shipment. A standard import permit is not provided with this manual since provinces or regions have developed import permits in response to their individual needs.

The notifiable disease agents in Schedule IV are those not listed in Schedules II or III, but considered important by the Fish Health Official. In special cases, just cause may exist for the Local Fish Health Officer to prevent the import of these notifiable disease agents or other fish pathogens into an area.

Local Fish Health Officers are located at offices listed in Appendix 2.

VI SAMPLING PROCEDURES

A. CULTURED FISH

1. Sampling by lot

Unless noted (see VI B 1), sampling of fish shall be according to "lot." A lot is defined as fish of the same age that have always shared the same water supply and that have originated from a discrete spawning population. In situations where this lot definition cannot be applied, the Fish Health Official will use his/her own discretion in dividing the fish into lots.

2. Selecting the sample

The method of determining the actual number of fish to be sampled from any particular lot is based on obtaining a 95% probability of detecting an infected specimen in a lot with an assumed prevalence of detectable infection of 5 or 10% (Table 1). It is important to note that certain disease agents when in the carrier state are very difficult to detect. The Fish Health Official and the producer must be aware of this possibility. Statistical probabilities as stated in Table 1 may not apply in such situations. The samples must be taken under the supervision of the Fish Health Official in a manner and at a time that tends to provide the greatest opportunity of detecting any disease agent present. When the sample is being withdrawn from a lot held in a single holding unit (e.g. tank, raceway, or pond), the sample must be selected to contain as many moribund and freshly dead specimens as are available. If the previously mentioned lot of fish is being held in more than one holding unit, the total

TABLE 1. Sample size required to detect one or more infected specimens in populations (lots) with an assumed minimum prevalence of detectable infection of 5 and 10%. Calculations are based on a 95% level of confidence. For intermediate population sizes, use the sample size for the next larger population listed. (From Ossiander and Wedemeyer, 1973.)

Population size	Number or fish to be sampled when assumed prevalence of detectable infection is:	
	5%	10%
50	29	20
100	43	23
250	49	25
500	54	26
1,000	55	27
2,500	56	27
5,000	57	27
10,000	57	27
100,000	57	27
Over 100,000	60	30

number of specimens to be collected would be the same as before. However, the specimens must be taken from the individual units in numbers that reflect the proportion of the lot held in each of the units. Again, the sample from any given unit must consist of as many moribund and freshly dead fish as are available. If additional fish are required to complete the sample, apparently healthy fish may then be collected, or the Fish Health Official may elect to return within a 30-day period to complete collection of the required number of fish.

The samples should not be taken during or immediately after therapeutic treatment. Complete background information for all samples must be obtained. This includes data relating to any recent use of chemotherapeutants, the health history of the facility, and the lots from which the samples were taken.

In the event that overt disease signs are noted at the time of sampling, procedures for the detection of notifiable disease agents and other pathogens should be carried out in addition to the procedures for identification of disease agents listed in Schedule II.

Where samples of fish or their tissues are to be processed in pools, as in the virological assays, rather than individually, care must be taken to process those from apparently healthy fish separately from those of freshly dead or moribund fish.

3. Sample size for viruses

a) Production fish (non-broodstock fish): the sample size to be employed is one that gives a 95% probability of detecting an infected specimen in a lot, assuming the minimum prevalence of detectable infection is 5%.

b) Broodstock (sexually mature fish held for reproductive purposes): the same sensitivity in detecting infected individuals must be aimed at. Sampling must be conducted once yearly at spawning time. In those species for which spawning is a terminal event, tissue samples must be collected from all fish involved up to a maximum of 60 fish. For those species that are repeat spawners, 10%[1] of all spawners used up to a maximum of 30 fish, must be subjected to lethal sampling. The balance of the samples required to achieve the rate that provides a 95% probability of detecting an infected fish in a lot, assuming the minimum prevalence of detectable infection is 5%, is to be made up of reproductive fluids. Ovarian fluid must account for as many as possible of the reproductive product samples collected.

---

[1]The lethal sampling of only 10% of all the spawners does not conform to the sampling rates set out in Table 1; it is intended to conserve small but valuable populations of spawners that may live to spawn again.

4. Sample size for bacteria

a) Production fish must be sampled for bacterial pathogens at a rate that provides a 95% probability of detecting an infected specimen in a lot assuming the minimum prevalence of detectable infection is 5%. For routine purposes, only fish averaging four cm or more in fork length need be bacteriologically sampled. Reliable bacteriological sampling of fish smaller than four cm in fork length is technically more difficult; such fish need be sampled only when unusual and unexplained mortality rates or disease signs are observed.

b) Broodstock must be sampled for bacteria in accordance with the sample size already outlined for the lethal sampling of broodstock for virus (see VI A 3 b).

5. Sample size for parasites

a) Production fish must be sampled for Myxosoma cerebralis and Ceratomyxa shasta at a rate that provides a 95% probability that an infected fish will be detected in a lot assuming the minimum prevalence of detectable infection is 5%.

M. cerebralis: the fish must be at least 120 days of age for the test to be meaningful because the spores on which the diagnosis is based are slow to develop. In fish grown or held at temperatures below 12°C, spore formation may take 9-11 months (Taylor et al. 1973).

C. shasta: routine monitoring of apparently healthy fish for the presence of spores need be performed only with fish averaging at least 120 days of age. Younger fish need be examined for C. shasta only when unusual and unexplained mortality rates or disease signs are observed.

b) Broodstock must be sampled in accordance with the sample size already outlined for the lethal sampling of broodstock for virus (see VI A 3 b).

6. Times of sampling and frequency

a) Production fish: sampling will be conducted at least twice yearly with sampling times and frequency depending on local conditions and the discretion of the Fish Health Official. Because the detection of M. cerebralis and certain viruses is best accomplished using fish of a certain age, spring and fall sampling periods (March-May and September-November) are recommended.

b) Broodstock: sampling will be conducted once yearly at spawning time (see VI A 3 b).

B. WILD FISH

1. Sexually immature fish

All sexually immature fish taken from the wild must be sampled at a rate that will give a 95% probability of detecting an infected specimen in the total catch, assuming the minimum prevalence is 5%. This sampling rate will apply to the types of pathogens (viral, bacterial, and myxosporean) mentioned earlier. The Fish Health Official may use considerable discretion when determining an appropriate sample size for wild fish.

2. Sexually mature fish

If wild spawners or their fertilized eggs are to be collected, seminal and ovarian fluids must be taken from all the fish involved, up to a maximum of 60 fish. In those species for which spawning is a terminal event, tissue samples must be collected from all fish involved (lethal sampling) up to a maximum of 60 fish. For those species that are repeat spawners, 10%[2] of all spawners used or collected, up to a maximum of 30 fish, must be subjected to lethal sampling. These sampling rates apply to the types of pathogens (viral, bacterial and myxosporean) mentioned earlier. Again, considerable discretion must be used by the Fish Health Official when certifying wild stocks.

C. FERTILIZED EGGS AND SEX PRODUCTS

The sampling of fertilized eggs or the sex products of fish cannot be relied on to detect disease agents listed in Schedule II. The threat to fish health posed by such eggs or sex products must, therefore, be determined by examining the disease status of the parent fish.

D. NON-SALMONID SPECIES

Other species not belonging to the family Salmonidae occurring at the same facility as salmonid species are subject to sampling by the Fish Health Official for disease agents listed in Schedules II or III.

---

[2]See footnote 1.

VII TRANSPORTATION OF SAMPLES

Fish samples must be handled rapidly in such a way that degenerative changes do not render diagnosis unreliable or impossible. If samples cannot be brought to the laboratory alive, they should be stored on ice or refrigerated for no longer than 48 hours.

A. LIVE FISH

Live fish should be transported in sealed plastic bags that have been partly filled with water and charged with oxygen. The bags may then be placed with ice in insulated containers. Under these conditions anesthetics are not usually required.

B. DEAD FISH

Fish sampled should be placed in sealed plastic bags (dead or moribund fish should be kept separately from healthy fish) that are packed in an insulated container with a layer of ice around each bag.

C. REPRODUCTIVE FLUIDS

Seminal and ovarian fluid samples should be shipped in sealed containers on ice. Do not mix seminal and ovarian fluid samples. For pooling restrictions see X B 4 b and X C.

VIII TREATMENT OF SAMPLES

A. AUTOPSY PROCEDURE

1. General comments

The procedure outlined below is designed to facilitate the processing of large numbers of fish for the designated pathogens. Except for very small specimens, the same fish will serve as the source of tissues for the various bacteriological, virological, and myxosporean tests. The bacteriological examination must be performed first. To maximize detection sensitivity, fish must be autopsied within 48 h of sampling and all assay procedures should be initiated within this time.

2. External examination and sampling

Note all gross abnormalities such as body discoloration, body distention, exophthalmia, ulcers, blebs, inflammation, hemorrhagic areas, clubbed or necrotic gills, and eroded opercula, fins and caudal peduncles. Inoculate the appropriate media and prepare stained smears with material from these lesions.

3. Internal examination and sampling

Disinfect the surface of the fish and using aseptic techniques expose the kidney. Inoculate the appropriate media and prepare the appropriate smears with kidney material.

Inspect the viscera for abnormalities. Inoculate the appropriate media and prepare smears with material from any abnormal organs. Remove tissues for virological and myxosporean examinations.

B. DISPOSAL OF SAMPLES

The receiving laboratory should handle and dispose of samples and other items likely to be infectious in a manner that precludes the dissemination of disease agents. All materials such as fish carcasses or tissues, transport containers and water, microbial cultures, and contaminated equipment should be autoclaved, incinerated, or otherwise sterilized before being discarded.

IX PROCEDURES FOR THE DETECTION OF CERTAIN BACTERIAL FISH PATHOGENS

A. SCOPE

The microorganisms covered by these procedures are divided into three categories:

1. Those pathogens (listed in Schedule II) considered to be limited in geographical distribution and the absence of which must be verified. These include the following certifiable disease agents:
   Renibacterium salmoninarum (Bacterial kidney disease)
   Yersinia ruckeri (Enteric redmouth disease)
   Aeromonas salmonicida (Furunculosis)

2. Those pathogens (listed in Schedule IV) that may be ubiquitous, and if detected during a disease outbreak or systemically in the absence of clinical signs in sampled fish, are notifiable. These include:
   Myxobacteria (e.g., Flexibacter columnaris)
   Motile Aeromonas sp. (e.g., Aeromonas hydrophila)
   Pseudomonas spp. (e.g., Pseudomonas fluorescens)
   Vibrio spp. (e.g., Vibrio anguillarum)

3. Those bacterial agents not listed in Schedules II and IV, which the Fish Health Official detects and determines to be associated with significant losses and/or disease signs (e.g., Edwardsiella tarda).

B. PROCEDURES

The following procedures represent the minimum requirements in bacteriological testing; they must be applied to all samples taken from lots in which there is an unusually high prevalence of disease signs and/or mortalities. In samples from apparently healthy lots the procedures need only be applied to those fish averaging four cm or more in fork length (see VI A 4 a).

1. Aseptically obtain the following tissues/material and streak on the appropriate medium:
   a) kidney tissue, preferably from sites that appear abnormal, and external/internal lesion material on Tryptic Soy Agar (TSA);
   b) gill tissue and/or external lesion material on Shieh's medium (SH agar) or Cytophaga Agar (CA) only if gross pathology suggests a myxobacterial infection.

2. Prepare Gram-stained smears of kidney tissue and lesion material and examine a minimum of 25 fields (900-1000X magnification). The presence of small Gram-positive diplobacilli, frequently present intracellularly, is presumptive evidence for R.

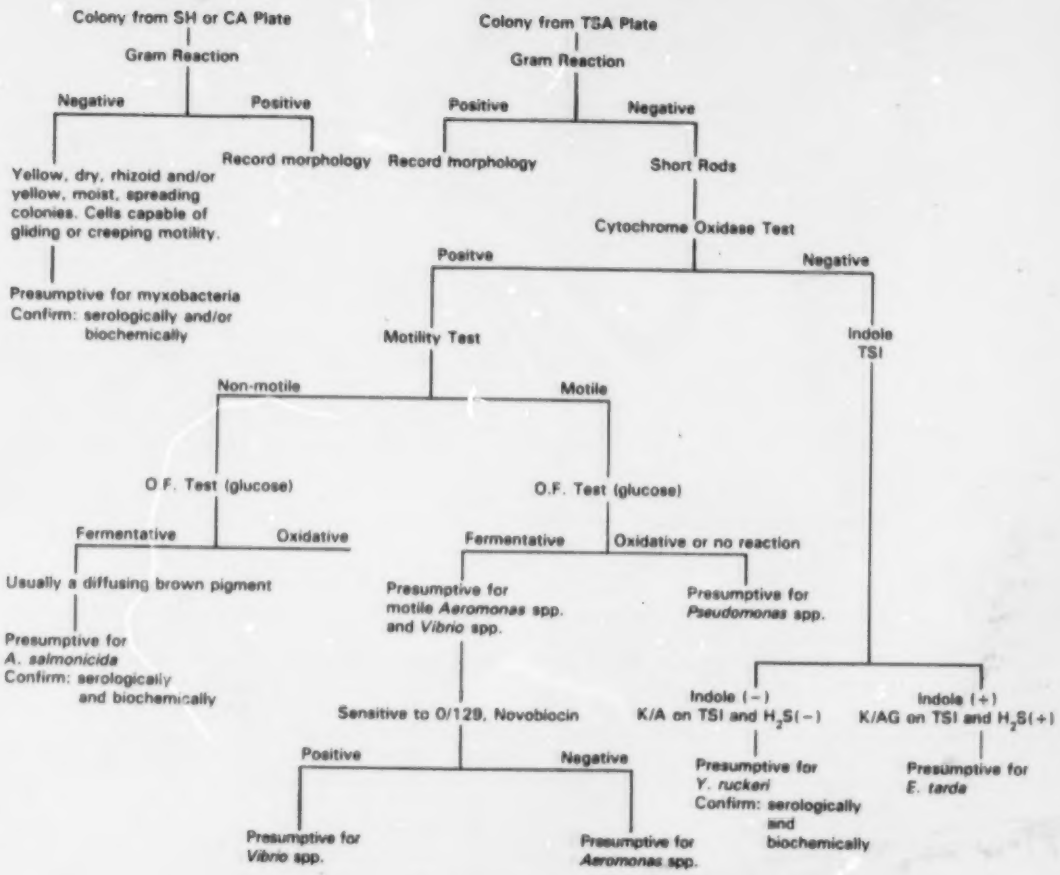

FIG. 1. Differentiation of bacterial isolates from fish on TSA, SH or CA plates.

salmoninarum (Sanders and Fryer 1980). (Presumptive evidence is strengthened by lack of growth on TSA.)

3. Incubate the TSA plates at 20°C for five days; examine daily for growth. Incubate the SH or CA plates at 15-20°C for five days; examine daily for growth.

4. If gross pathology suggests a myxobacterial infection, prepare moist mounts of gill tissue and/or lesion material and examine for the presence of masses of long, thin rods. Select young representative colonies (yellow dry, rhizoid or yellow, moist, spreading) from the SH or CA plates and prepare Gram-stained smears. The presence of long, thin, Gram-negative rods, capable of gliding or creeping motility, constitutes a presumptive diagnosis for myxobacteria.

5. Select young representative colonies from TSA plates. Differentiate the microorganisms on the basis of the following characteristics:

   a) If the cells are Gram-negative, rod-shaped, oxidase-positive, non-motile, ferment glucose (O.F. test) and usually produce a brown diffusing pigment, the isolate is presumptively A. salmonicida (Griffin et al. 1952). Achromogenic strains of A. salmonicida may occur (Evelyn 1971).
   b) If the cells are Gram-negative, rod-shaped, oxidase, indole and H_2S-negative and produce an alkaline/acid (K/A) reaction in Triple Sugar Iron Agar (TSI), the isolate is presumptively Y. ruckeri.
   c) If the isolate differs from 5 b) by being indole and H_2S-positive and produces both acid and gas in TSI, it is presumptively E. tarda (Amandi et al. 1982).

   A flow chart is given for these procedures in which additional features separating motile aeromonads, Pseudomonas spp., and Vibrio spp. are indicated (Fig. 1).

   Confirmatory testing of presumptively identified certifiable agents must be performed. For a possible exception, see IX C 2 g. The serological and biochemical tests described in IX C 2 are to be used for confirmatory testing.

   Confirmatory tests for the notifiable agents may be performed at the discretion of the Fish Health Official. Identification should be based on whether or not the disease agent is associated with significant losses and/or gross pathology.

C. MATERIALS[3] AND METHODS

1. Primary isolation media

   a) Tryptic Soy Agar (Difco).

   b) SH Agar (Shieh 1980)

Agar	1.0%
Peptone	0.5%
Yeast extract	0.05%
Magnesium sulfate	0.03%
Sodium pyruvate	0.01%
Monobasic potassium phosphate	0.01%
Dibasic potassium phosphate	0.005%
Sodium bicarbonate	0.005%
Calcium chloride	0.001%
Citric acid	0.001%
Sodium acetate	0.001%

[3]The products specified have proven satisfactory for the purposes indicated; this, however, does not imply that other products may not be equally satisfactory.

Barium chloride	0.001%
Ferrous sulfate	0.0001%
pH	7.0

NOTE: This is a modification of Shieh's medium. Neomycin (5 µg/mL) and polymyxin B (10 units/mL) can be added to SH agar to facilitate the isolation of myxobacteria by suppressing the growth of other bacteria (Fijan 1969).

c) Cytophaga Agar (Anacker and Ordal 1959)

Tryptone	0.05%	Beef extract	0.02%
Yeast extract	0.05%	Agar	0.9%
Sodium acetate	0.02%	pH	7.2-7.4

2. Test media, reagents, and methods

a) Cytochrome oxidase test
Using a platinum loop, transfer some bacterial growth from an actively growing plate culture to a paper strip impregnated with the appropriate chemicals. After thorough spreading, a positive test is indicated by the development of a bright blue color within a minute (MacFaddin 1980).

b) Motility
Examine log-phase cultures in wet preparations using Tryptic Soy Broth as the suspending medium. If the wet preparation method gives a doubtful result, check the results by stab-inoculating tubes of Motility Test Medium (Difco) or Glucose Motility Deep (GMD) medium (Walters and Plumb 1978).

c) Differentiation between oxidative and fermentative carbohydrate metabolism.
Perform an O.F. test (glucose) as described by MacFaddin (1980). Alternatively, inoculate tubes of GMD medium and interpret the results as described by Walters and Plumb (1978).

d) Indole production
Perform the test for indole production (MacFaddin 1980).

e) Triple sugar iron agar
The use of TSI agar and the interpretation of the results of this medium are described by MacFaddin (1980).

f) Confirmatory slide agglutination test for A. salmonicida (Rabb et al. 1964) and Y. ruckeri.
The agglutination test is performed by emulsifying a small amount of bacterial growth in saline (0.9% NaCl) on a clean glass slide. A loopful of antiserum is placed adjacent to the bacterial suspension and the two are mixed by gentle rocking and tilting of the slide. Prepare the appropriate positive and negative controls. A rapid macroscopic clumping of bacterial cells in the test mixture and the positive control (but not in the negative control) constitutes a positive agglutination test. Agglutination in the negative control invalidates the test. Many strains of A. salmonicida autoagglutinate. To prevent autoagglutination place the suspension in boiling water for 15 min prior to performing the slide agglutination test.

g) Confirmatory tests for R. salmoninarum.

If clinical signs or examinations of Gram-stained kidney smears suggest the presence of R. salmoninarum, retain a portion of the suspect kidney tissue and perform one of the following confirmatory tests. If such kidney tissue is unavailable, the presumptive evidence for R. salmoninarum noted earlier (IX B 2) constitutes a confirmed diagnosis.

(1) Immunodiffusion test (Chen et al. 1974)

Prepare immunodiffusion plates by adding ten mL of medium consisting of Noble agar (1.0%), NaCl (0.9%), and thimerosal (0.01%) to a 60-mm petri plate. Punch a pattern of six mm diameter wells, six of them peripheral to a center well, so that all wells are six mm apart. Place 0.1 mL specific antiserum in the center well. Load the peripheral wells separately with 0.1 mL of saline (negative control), a heavy R. salmoninarum cell suspension in saline (positive control), and a 50% kidney homogenate in saline (test sample). Arrange the loading so test samples are adjacent to positive controls. Incubate the plates in a moist chamber at 15°C for 48 h. A precipitin line of identity or partial identity between a test sample and a positive control constitutes a positive test.

(2) Direct fluorescent antibody test (DFAT) (Bullock et al. 1980)

Prepare a kidney smear on a clean glass slide, allow to air dry and fix for 5-8 min in acetone at 20°C. Add 1-2 drops of the recommended optimal dilution of conjugated anti R. salmoninarum serum containing a 1:150-1:200 dilution of rhodamine counterstain (Difco) to the slide and allow to react for 5-8 min at 20-25°C. Rinse the slide and wash for two min in phosphate buffered saline (pH 7.2) and air dry. Add a drop of mounting fluid (pH 9.0) to the test area, add a coverslip and examine a minimum of 25 fields under oil immersion using a microscope equipped with an ultraviolet light source. A positive control should be prepared and stained in a similar manner. The presence of small fluorescing diplobacilli of typical size and shape constitutes a positive test.

(3) Indirect fluorescent antibody test (IFAT) (Bullock and Stuckey 1975)

The indirect fluorescent antibody test can be used in place of the immunodiffusion test and DFAT to confirm the presence of R. salmoninarum. Consult the reference for the proper procedure.

h) Biochemical confirmation of A. salmonicida and Y. ruckeri

Confirmatory testing of presumptively identified isolates of A. salmonicida and Y. ruckeri is performed using conventional media (Difco) as described by Edwards and Ewing (1972) or the API-20E miniaturized diagnostic system (Analytab Products Inc., Plainview, NY, U.S.A.) and comparing the results with those obtained for known (positive control) cultures of the disease agent.

(1) Streak bacterial growth on TSA and incubate at 20°C for 24-48 h to obtain a pure culture.

(2) Prepare and inoculate separately the suspect bacterial culture and the known culture as recommended (Difco, Analytab Products Inc.). When confirming presumptively identified isolates of Y. ruckeri, a saline suspension having a final turbidity equivalent to that of a #1 McFarland turbidity standard is recommended as the inoculum.

(3) Incubate the inoculated biochemical test media at 20°C for 24-72 hours. Add the necessary reagents and read the test results as recommended (Difco, Analytab Products Inc.).

(4) Compare the results obtained for the suspect isolate to those of the known bacterial culture(s). For interpretation of the biochemical profiles for A. salmonicida consult the papers by Paterson (1974) and Paterson et al. (1980); and for Y. ruckeri consult the paper by Stevenson and Daly (1982).

i) Sensitivity to the vibriostatic agent 0/129 and the antibiotic novobiocin

The test is performed on TSA plates by applying a 0/129 disk and a novobiocin (5 µg) disk (Difco) to the medium that has been uniformly surface-seeded with the organism under test. After incubation at 20-22°C for 16-24 h, sensitive organisms show a clear zone around the disk. To prepare 0/129 disks, saturate Whatman antibiotic assay filter paper disks (6 mm) with 0.1% 0/129 in acetone. Drain off excess solution and dry the disks at 37°C. The vibriostatic agent 0/129 (2, 4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine) is obtainable from British Drug Houses in Canada and from Calbiochem in the U.S.A. A control disk impregnated only with acetone should be included to preclude the possible inhibitory reaction due to acetone.

j) Agar block motility test for myxobacteria

(1) Excise a five mm square block of agar supporting a suspected myxobacterial colony. Place the block, colony side up, on a glass slide and cover gently with a cover slip.

(2) Examine the margin of the colony under high power for evidence of gliding or creeping motility.

k) Confirmatory serological tests

Confirmation of identity of bacteria by serological tests such as slide, tube, or micro-well agglutination reactions should be carried out using standard procedures. Sera used should be standardized, preferably adsorbed and appropriate for the purpose. Positive and negative control organisms must be included.

X PROCEDURES FOR THE DETECTION OF VIRUSES

A. SCOPE

1. Any filterable agent in the fish samples that replicates intracellularly in any of the specified cell lines is certifiable whether or not it can be identified with presently available antisera and whether pathogenicity for salmonids exists or is unknown. Methodology is dependent upon detection of cytopathic effects (CPE) in susceptible cell cultures.

2. Any abnormal proliferative lesions (tumors) encountered should be processed by histological methods, and the results of the histopathologic evaluation reported.

B. TISSUES TO BE ASSAYED

1. Sac fry: assay whole. When present, yolk sacs should first be removed and discarded.)

2. Fish averaging 2-4 cm in fork length: remove and discard heads, but retain gills; cut off the tails just posterior to the vents. Mince the remainder of the carcasses and assay.

3. Fish averaging 4-10 cm in fork length: excise the gills, then eviscerate and assay the combined viscera and gills. After removal of the gills, evisceration is readily accomplished by first cutting off the head, then slitting open the body cavity from the cut end to the vent, and finally cutting and scraping to remove the viscera (including kidney).

4. a) Fish averaging 10 cm or more in fork length: assay mixtures of kidney, spleen, pyloric caeca-pancreas, and gill. The appropriate relative volumes of these tissues should be 3:1:1:1, respectively. One part each of anterior, central, and posterior kidney must be represented in the sample.

   b) When the fish in this size category are brood fish, and reproductive fluids are to be used, as many as possible of the reproductive fluid samples must be from female fish. For maximum sensitivity, assay reproductive fluid samples individually.

C. POOLING

Tissues from a maximum of five fish may be pooled to form one sample. But when preparing pooled samples, apparently healthy fish (or their tissues) must not be pooled with dead and moribund fish (or their tissues).

D. PREPARING INOCULA

Samples must be processed within 48 h of collection (see VIII A 1). Prior to and during processing, samples must be kept refrigerated or on ice, but not frozen.

1. Solid tissues: weigh and then homogenize the tissues in a minimal volume of balanced salt solution (BSS) such as Earle's or Hanks' BSS at pH 7.6-7.8. Two methods are available:
   a) Use a sterile Ten Broeck, or homogenizer designed to allow cooling on ice during homogenization to process small fish or small amounts of tissue. Care should be taken to prevent possible aerosol dissemination of virus.
   b) Use a sterile pre-chilled motar and pestle to grind the tissues with a small quantity of sterile sand (80-120 mesh silica) until a smooth paste is formed.
   Equipment used for homogenization of pooled samples within any given lot need not be sterilized between each use.
   After tissues have been triturated, dilute each sample extract to a final concentration of 2% tissue suspension in BSS. Centrifuge the extracts at 2500 x g for 15 min at 4°C and aseptically filter the clarified supernatant through a 0.45 µm pore diameter membrane filter. To avoid any appreciable loss of virus by adsorption on the filter, collect the maximum possible volume of filtrate.

2. Fluid samples: dilute 1:2 with cold Eagle's minimum essential medium (MEM) at pH 7.2-7.6. Centrifuge at 2500 x g for 15 min at 4°C. Decontaminate as in X D 1.

E. ASSAY

1. Cell cultures
   For virus assay use two of the following three continuous cell lines: rainbow trout gonad (RTG-2), chinook salmon embryo (CHSE-214), and fathead minnow (FHM). The FHM line must be used in IHN virus enzootic areas.
   Biannually or before each inspection season all stock cell cultures should be tested and found to be free of mycoplasma. Each cell type must also be tested for susceptibility to viruses enzootic to the region (i.e. state, province or watershed). The donor cell cultures used to prepare monolayers for virus detection must be no older than two weeks.
   Additional information on fish cell culture and virology can be found in McAllister (1979), Pilcher and Fryer (1980), Wolf and Quimby (1969) and Wolf (1970).

2. Either of the following procedures may now be used:

   a) Inoculation of preformed monolayers.

      (1) Prepare duplicate monolayers of each of two cell lines for each sample to be tested. Plastic multidishes

suitable for tissue culture (1.5 to 2.0 cm diameter wells) may be used sealed or unsealed (with the appropriate organic buffer incorporated in the medium).

(2) Use 1.0 mL per well of Eagle's MEM at pH 7.6-7.8 containing Earle's salts, glutamine, and 10% fetal bovine serum (FBS). Alternate antibacterial mixtures for use in the medium are 100 IU penicillin/mL and 100 µg streptomycin/mL, or 50 µg gentamycin/mL. The use of a fungistat (e.g., 25 IU nystatin/mL) is also permitted.

(3) Incubate the cell cultures at 15-20°C; the temperature depends upon when they will be required for the assay. At the time of inoculation the cell monolayers must be 70-90% confluent and not more than 48 h old.

(4) The growth medium must be removed and the monolayers washed with BSS, which is removed prior to inoculating 0.1 mL of the filter sterilized sample into each well.

(5) Incubate the inoculated cell cultures at 15°C for 60-90 min. Every 20 min gently rock cultures to uniformly spread the inoculum. Add one mL of Eagle's MEM containing 2% FBS to each monolayer. Note: the new medium should be of the same composition as in E 2 a (2) except for decreased FBS and the final pH must be 7.6 to 7.8.

(6) Incubate cultures at 15°C.

b) Simultaneously applied cells and test sample.

(1) Place in tissue culture wells 1.0 mL of medium (see X E 2 a) containing sufficient cells to produce a 70-90% confluent monolayer on attachment. Duplicate cultures of two cell lines (see X E 1) are required per sample.

(2) Immediately add 0.1 mL of the filter sterilized sample to each culture.

(3) Incubate cultures at 15°C.

3. Controls

For each batch of donor cell cultures, duplicate negative controls must be run. Negative controls must consist of cultures inoculated according to the procedure used for the assays, except that sterile BSS must be used in place of the sample.

4. Procedures to be followed during incubation

a) Inspect the cultures shortly after inoculation and after 24 h. Thereafter examine cultures at least every day to determine whether CPE has been produced.

b) A sample is considered negative if there is no CPE in the cultures 14-21 days postinoculation.

c) If CPE occurs in one or more of the cultures inoculated with the samples, the presence of a filterable, replicating agent must be verified. Filter (0.45 µm pore diameter) the culture fluid from the test well(s) showing CPE, dilute the filtrate

with BSS to 10^{-1} and 10^{-3}, and inoculate 0.1 mL of each of the dilutions into fresh duplicate cultures of the same cell line. If CPE is again observed, proceed with the serum neutralization test.

F. SERUM NEUTRALIZATION TEST

Presumptive identification of the agent producing CPE may be made on the basis of clinical evidence at sampling and on the type of CPE produced. Identification is accomplished by neutralization of the agent with specific antiserum. Failure to obtain any degree of neutralization using antisera prepared against known viruses will usually indicate the presence of a previously unrecognized virus or an atypical serotype of a known salmonid virus.

1. Procedure

a) Use a dilution of antiserum sufficient to neutralize an equal volume of a suspension containing 10^{2}-10^{3} $TCID_{50}$ per mL of the homologous virus.

b) Filter the fluid from a culture showing CPE through a 0.45 µm pore diameter membrane filter. Dilute the filtrate 10^{-2} and 10^{-6} with sterile BSS.

c) (1) Mix 0.3 mL of the diluted antiserum with 0.3 mL of each of the dilutions of sample.
(2) Mix 0.3 mL of normal serum with 0.3 mL of each of the dilutions of test sample.
(3) In the same manner, perform the serum neutralization test on the positive controls using homologous antiserum and normal serum.

d) Incubate the reaction mixtures at 15°C for 30-60 min and then inoculate 0.2 mL of each mixture into duplicate cultures of the cell line in which the virus was isolated.

e) Incubate the cultures at 15°C and observe for the production and inhibition of CPE. Inhibition of CPE by a particular antiserum, but not by normal serum, identifies the virus.

G. OTHER CONFIRMATORY METHODS

The approved methodology for detection of viruses is based upon isolation, followed by serological identification. Methods of confirming the identification of the cell culture isolates are not limited to the suggested serum neutralization test (X F). Other acceptable immunoserological tests may be used, including fluorescent-antibody microscopy, immunoperoxidase techniques, enzyme-linked immunosorbent assays, microtitration and microneutralization, plaque neutralization, complement fixation and immunoelectron microscopy.

XI PROCEDURES FOR THE DETECTION OF CERTAIN PARASITES

A. SCOPE

The absence of two myxosporean disease agents must be verified. These agents are Myxosoma cerebralis and Ceratomyxa shasta. Any other parasites detected which the Fish Health Official considers important should be reported.

B. PROCEDURES FOR MYXOSOMA CEREBRALIS

1. Fish for this procedure must be at least 120 days old, and preferably fresh. Frozen, but not formalin-preserved specimens may also be used. All glassware and equipment used in processing samples must be carefully cleaned to avoid carry-over of spores.

2. Decapitate fish and deflesh heads after heating in water at 45-50°C until the brain has coagulated. Remove the brain (and any attached spinal cord) intact. Discard to avoid possible contamination of skull material with spores of the related parasite Myxobolus neurobius that might be mistaken for M. cerebralis.

3. Either of the following procedures may be now used:

   a) Digestion method[a]
      (1) Pool up to approximately 100 g of the resulting skull material and macerate finely. Small initial fragment size will facilitate complete and rapid digestion.
      (2) Place in a beaker and add 25 mL of freshly prepared pepsin digest solution (1.0 g of pepsin dissolved in 100 mL of 0.5% HCl) to each gram of macerated material.
      (3) Mix well, let settle for 2 min and examine a sample from the surface of the supernatant at 400-450X magnification for typical spores using phase contrast microscopy.
      (4) If spores are not detected, incubate the mixture at 35-40°C for 1-1.5 h with gentle agitation. A cloudy, greyish suspension, free of large particles, should be present at the end of the digest period.
      (5) Place 50 mL of the suspension into conical, screw cap centrifuge tubes designed to hold 50 mL. Centrifuge at 1200 x g for 15 min at room temperature. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 1.0 mL of

[a]The procedure outlined above is a modification of the pepsin-trypsin digest method of Markiw and Wolf (1974a and 1974b).

distilled water. The contents of up to five tubes can be combined into one sample. Examine microscopically for spores as before.

(6) If no spores are detected, bring the volume of each sample to approximately six mL with distilled water. Layer the contents of each tube onto three mL of 55% aqueous glucose solution contained in a 12 mL conical centrifuge tube. Centrifuge at 1200 x g for 30 min at room temperature.

(7) Withdraw pelleted material with a Pasteur pipette and examine at least 25 microscope fields per sample as given in XI B 3 a (3). Observation of spores at any stage in the procedure constitutes a positive result.

b) Plankton centrifuge method (O'Grodnick 1975 and Prasher et al. 1971)

(1) Pool up to 100 g of skull material and macerate in a blender for five min with distilled water. Up to 200 mL of water per 100 g of skull material can be used.

(2) Remove the macerated material and vacuum filter through a fine (0.5-1.0 mm) wire mesh. If the filter clogs, rinse with distilled water to clear it allowing the rinse water to mix with the filtrate. Coarse material such as large bone chips are removed by this procedure and can be discarded.

(3) Place the filtrate in a separatory funnel located to discharge into a plankton centrifuge. Run the centrifuge at high speed while adding the filtrate in slowly.

(4) Centrifuge until all water has been removed. Scrape the residue from the wall of the centrifuge and place in a small bottle. Add five volumes of distilled water. Do not dilute beyond a total of 30 mL. Cap and shake the bottle until the material is uniformly suspended.

(5) Place a drop of the suspension on a slide or hemocytometer if quantitation is required.

(6) Examine at least 25 fields of the slide at 450X magnification for the presence of M. cerebralis spores using phase contrast microscopy.

4. Confirmatory identification of M. cerebralis spores must be based on the morphological characters given by Lom and Hoffman (1971).

C. PROCEDURES FOR CERATOMYXA SHASTA

1. Fish for the following procedures must be at least 120 days old; either fresh (preferably) or frozen specimens may be used.

2. The preferred organs for examination for C. shasta spores are the intestine and gall bladder. Peritoneal fluid may also contain

spores. Microscope slides of tissue, fluid and purulent material can be prepared and examined as required by either of two methods:

a) Wet mounts
Prepare wet mounts by gently mixing sufficient material in one or two drops of saline (0.9% NaCl) on a standard microscope slide to give a reasonably dilute suspension, cover with a cover slip and examine at 400-450X magnification, using phase contrast microscopy.

b) Dried smears
Smear material to be examined on a standard microscope slide, allow to air dry, stain 30-60 sec with Loeffler's methylene blue (dissolve 0.3 g of methylene blue chloride in 30 mL of 95% ethanol and add 100 mL of 0.1% aqueous KOH), rinse with water and air dry. Add a drop of immersion oil or water to each smear, cover with a cover slip and examine at 400-450X magnification for the presence of spores. The polar capsules and extended polar filaments stain an intense blue and the sporoplasm stains a pale blue.

3. For fish less than 7.5 cm in fork length, material for examination can be expressed from the intestines. In addition, if nodular lesions are present in any tissue, or if ascitic fluid is evident, prepare smears or wet mounts of this tissue or fluid.

4. For fish 7.5 cm or more in fork length, open the body cavity and collect material lightly scraped from the interior wall of the upper intestine or gall bladder. If nodular lesions are observed on or in any tissue, especially the pyloric ceca, or if any abnormal accumulations of fluid are found, they must be examined for spores of C. shasta.

5. For each smear or wet mount at least 25 microscope fields must be examined for spores of C. shasta.

6. The identification of C. shasta spores must be based on the diagnostic characters given by Johnson et al. (1979). Pre-spore stages of C. shasta may be found without accompanying spores; by themselves they are not diagnostic for the organism and their presence indicates that further samples and search for the characteristic spores should be made (Noble 1950; Yamamoto and Sanders 1979).

Additional information on identification of fish disease agents can be found in McDaniel (1979).

XII EGG DISINFECTION PROCEDURES

Salmonid eggs are safely disinfected as green eggs following fertilization and water hardening, or as early eyed eggs. The following is a suggested procedure for egg disinfection, utilizing iodophors. Iodophors for disinfection are usually povidone or polyalcoholic complexes of iodine in which the solubilized iodine confers its broad spectrum germicidal activity but is not as corrosive or irritating as in its elemental form. A number of topical disinfectants[5] of this type are available commercially in North America; among these are Ovadine®, Bridine®, Betadine®, Actomar K30®, Wescodyne® and Argentyne®. Most contain a 1-2% active iodine concentration.

A. PREPARATION OF THE DISINFECTANT

1. Dilute the stock iodine-based disinfectant to give a solution containing 100 parts per million (ppm) of active iodine. The disinfectant must be prepared in water with a low organic content to minimize loss of the free iodine. Use a plastic, glass, stainless steel or fiberglass tank for preparing the holding the solution.

2. Check the pH of the diluted disinfectant and, if necessary, adjust to 6.5-7.5 using 8% aqueous sodium bicarbonate (baking soda).

B. DISINFECTION PROCEDURE

1. Use a fresh solution of diluted disinfectant.

2. To avoid temperature shock, adjust the disinfectant solution to the same temperature as the subsequent egg incubation temperature.

3. In the case of freshly fertilized eggs, allow eggs to water harden one hour before disinfection.

4. Immerse water hardened green eggs or early eyed eggs in the disinfectant for ten min.

5. Treat approximately 2000 eggs per liter before discarding the disinfectant.

6. Rinse eggs thoroughly in uncontaminated water after disinfection.

---

[5]The products specified have proven satisfactory for the purposes indicated; this, however, does not imply that other products may not be equally satisfactory.

7. Arrange the egg handling program to ensure that disinfected eggs do not have subsequent contact with contaminated equipment, water or personnel.

Diluted iodophors can also be used to disinfect work surfaces, utensils, nets and other equipment used during the egg taking process, but rinse thoroughly in clean, uncontaminated water following the disinfection.

REFERENCES

AMANDI, A., S.F. HIU, J.S. ROHOVEC and J.L. FRYER. 1982. Isolation and characterization of Edwardsiella tarda from fall chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Appl. Envir. Microbiol. 43: 1380-1384.

ANACKER, R.L., and E.J. ORDAL. 1959. Studies on the myxobacterium Chondrococcus columnaris. 1. Seriological typing. J. Bacteriol. 78: 25-32.

BULLOCK, G.L., B.R. GRIFFIN and H.M. STUCKEY. 1980. Detection of Corynebacterium salmoninus by direct fluorescent antibody test. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 719-721.

BULLOCK, G.L. and H.M. STUCKEY. 1975. Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 32: 2224-2227.

CHEN, P.K., G.L. BULLOCK, H.M. STUCKEY, and A.C. BULLOCK. 1974. Serological diagnosis of corynebacterial kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 31: 1939-1940.

EDWARDS, P.R. and W.H. EWING. 1972. Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. 362 p.

EVELYN, T.P.T. 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen Aeromonas salmonicida isolated from a marine host, the sablefish (Anoplopoma fimbria) and from two species of cultured Pacific salmon. J. Fish. Res. Board Can. 28: 1629-1634.

FIJAN, N.N. 1969. Antibiotic additives for the isolation of Chondrococcus columnaris from fish. Appl. Micro. 17: 333-334.

GRIFFIN, P.J., S.F. SNIESZKO, and S.B. FRIDDLE. 1952. A more comprehensive description of Bacterium salmonicida. Trans. Am. Fish. Soc. 82: 129-138.

JOHNSON, K.A., J.E. SANDERS, and J.L. FRYER. 1979. Ceratomyxa shasta in salmonids. U.S. Fish and Wild. Serv., Fish Dis. Leafl. No. 58, Washington, DC. 11 p.

LOM, J. and G.L. HOFFMAN. 1971. Morphology of the spores of Myxosoma cerebralis and M. cartilaginis (Hoffman, Putz, and Dunbar 1965). J. Parasitol. 57(6): 1302-1308.

MacFADDIN, J.F. 1980. Biochemical tests for the identification of medical bacteria, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 527 p.

MARKIW, M.E., and K. WOLF. 1974a. Myxosoma cerebralis: Isolation and concentration from fish skeletal elements - sequential enzymatic digestions and purification by differential centrifugation. J. Fish. Res. Board Can. 31: 15-20.

1974b. Myxosoma cerebralis: Comparative sensitivity of spore detection methods. J. Fish. Res. Board Can. 31: 1597-1600.

McALLISTER, P.E. 1979. Fish viruses and viral infections, In: Comprehensive Virology, Vol. 14, Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R. eds., Plenum Press, New York and London. 401-470.

McDANIEL, D. (ed.). 1979. Fish health bluebook: procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish. Health Sec., Am. Fish. Soc., Bethesda, MD. 118 p.

NOBLE, E.R. 1950. On a myxosporidian (protozoan) parasite of California trout. J. Parasitol 36: 457-460.

O'GRODNICK, J.J. 1975. Whirling disease Myxosoma cerebralis: Spore concentration using the continuous plankton centrifuge. J. Wildl. Dis. 11: 54-57.

OSSIANDER, F.J., and G. WEDEMEYER. 1973. Computer program for sample sizes required to determine disease incidence in fish populations. J. Fish. Res. Board Can. 30: 1383-1384.

PATERSON, W.D. 1974. Biochemical and serological differentiation of several pigment producing aeromonads. J. Fish. Res. Board Can. 31: 1259-1261.

PATERSON, W.D., D. DOUEY, and D. DESAUTELS. 1980. Isolation and identification of an atypical Aeromonas salmonicida strain causing epizootic losses among Atlantic salmon (Salmo salar) reared in a Nova Scotian hatchery. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 2236-2241.

PILCHER, K.S., and J.L. FRYER. 1980. The viral diseases of fish: A review through 1978 Part 1: Diseases of proven viral etiology. CRC Critical Reviews in Microb. 7(4): 287-363.

PRASHER, J.B., W.M. TIDD, and R.A. TUBB. 1971. Techniques for extracting and quantitatively studying the spore stage of the protozoan parasite Myxosoma cerebralis. Prog. Fish-Cult. 33: 193-196.

RABB, L., J.W. CORNICK, and L.A. McDERMOTT. 1964. A microscopic slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish. Prog. Fish-Cult. 26: 118-119.

SANDERS, J.E. and J.L. FRYER. 1980. Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 30(2): 496-502.

SHIEH, H.S. 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, Flexibacter columnaris. Microbios Letters, 13: 129-133.

STEVENSON, R.M.W. and J.G. DALY. 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of Yersinia ruckeri. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 870-876.

TAYLOR, E.L., S.J. COLI, and D.R. JUNELL. 1973. Attempts to control whirling disease by continuous drug feeding. J. Wildl. Dis. 9: 320-325.

WOLF, K. 1970. Guidelines for virological examination of fishes, In: A symposium on diseases of fish and shellfish. Am. Fish. Soc., Spec. Publ. No. 5, Washington, DC. 327-340.

WOLF, K. and M.C. QUIMBY. 1969. Fish cell and tissue culture, In: Fish Physiol. Vol. 3, Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds. Academic Press, New York, NY. 253-305.

YAMAMOTO, T. and J.E. SANDERS. 1979. Light and electron microscopic observations of sporogenesis in the myxosporidium, Ceratomyxa shasta (Noble 1950). J. Fish Dis. 2: 411-428.

APPENDIX 1 NATIONAL REGISTRY OF FISH DISEASES

The National Registry of Fish Diseases is a data center for the documentation and dissemination of information pertaining to fish diseases in Canada. Fish Health Laboratory Reports of all disease examinations in Canada, not only those specifically for certification purposes but also those from routine periodic sampling programs should be submitted routinely to the Registry by Fish Health Officials.

The National Registry of Fish Diseases will:

1. maintain close watch on geographic distribution and prevalence of fish diseases in Canada and identify emerging disease problems;

2. serve as a coordinating center in the event of national fish health emergencies;

3. provide periodic reports, analyses, and assessments on the state of fish health in Canada;

4. provide health histories of sources of live fish and eggs;

5. maintain and provide lists of certified Canadian and foreign fish production facilities;

6. maintain and provide lists of Local Fish Health Officers and Fish Health Officials approved by the Minister; and

7. maintain and provide lists of Canadian government approved, certifying officials in foreign countries involved in export of fish and eggs to Canada.

The address for the Registry is:

The National Registry of Fish Diseases,
Department of Fisheries and Oceans,
Ottawa, Ontario, Canada
K1A 0E6 (Tel. 613-990-0276; Telex 0534228)

APPENDIX 2 REGIONAL ADMINISTRATIVE AUTHORITIES

The Fish Health Protection Regulations are administered and applied by various provincial and regional authorities. In some areas provincial authorities are involved while other areas are a federal responsibility. The addresses follow:

1. Provincial fisheries authorities

Alberta
Fish and Wildlife Division,
Department of Energy and Natural Resources,
9915 - 108 Street,
Edmonton, Alta.
T5K 2C9 (Tel. 403-427-6730)

British Columbia
Fish and Wildlife Branch,
Ministry of Environment,
780 Blanshard Street,
Victoria, B.C.
V8V 1X5 (Tel. 604-387-1961)

Manitoba
Fisheries Enhancement Services,
Fisheries Branch,
Department of Natural Resources,
1495 St. James Street,
Winnipeg, Man.
R3G 0W9 (Tel. 204-944-7792; Telex 07-587740)

Ontario
Fisheries Branch,
Ontario Ministry of Natural Resources,
Queen's Park,
99 Wellesley St. West,
Toronto, Ont.
M7A 1W3 (Tel. 416-965-7886; Telex 06-219701)

Québec
Service de Pisciculture
Ministère du loisir, de la chasse et de la pêche
150, boul. St-Cyrille
Québec (Qué.)
G1R 4Y3 (Tel. 418-643-4664/7; Telex 051-3994)

Saskatchewan
Superintendent of Fisheries,
Fisheries Branch,
Department of Parks and Renewable Resources,
Box 3003,
Prince Albert, Sask.
S6V 6G1 (Tel. 306-922-9887)

2. Regional federal fisheries authorities

Manitoba
Inspection and Technology Branch,
Department of Fisheries and Oceans,
153 Lombard Ave.,
Winnipeg, Man.
R3B 0T3 (Tel. 204-949-4060; Telex 075-7419)

Newfoundland
Newfoundland Regional Office,
Fisheries Research Branch,
Department of Fisheries and Oceans,
P.O. Box 5667,
St. John's, Nfld.
A1C 5X1 (Tel. 709-772-2194; Telex 016-4698)

Northwest Territories
Department of Fisheries and Oceans,
Box 1008, Hay River,
N.W.T. (Tel. 403-874-2331; Telex 034-4324)

New Brunswick, Nova Scotia, Prince Edward Island
Scotia-Fundy Regional Office,
Department of Fisheries and Oceans,
P.O. Box 550,
Halifax, N.S.
B3J 2S7 (Tel. 902-426-2581; Telex 019-21819)

Gulf Regional Office,
Department of Fisheries and Oceans,
P.O. Box 5030,
Moncton, N.B.
E1C 9B6 (Tel. 506-758-9044; Telex 0142-607)

Ontario
Fishing and Industry Services,
Department of Fisheries and Oceans,
590 Keele Street, Room 410,
Toronto, Ont.
M6N 3E3 (Tel. 416-763-1161; Telex 06-22790)

Québec
Inspection and Technology Branch,
Department of Fisheries and Oceans,
1001 Pierre Dupuy,
Captain Bernier Laboratory,
Longueuil, Que.
J4K 1A1 (Tel. 514-283-4967)

Saskatchewan
District Manager,
Department of Fisheries and Oceans,
Immigration Building,
Prince Albert, Sask.
S6V 1E8 (Tel. 306-764-6424; Telex 074-29217)

Yukon and marine areas of British Columbia
Pacific Biological Station,
Department of Fisheries and Oceans,
Nanaimo, B.C.
V9R 5K6 (Tel. 604-756-7000; Telex 044-6128)

APPENDIX 3 QUALIFICATIONS OF FISH HEALTH OFFICIALS

A Fish Health Official carries the burden of a great deal of responsibility and therefore must be knowledgeable in the field of fish health and thoroughly familiar with the methodology for diagnosing fish diseases and their causative infectious agents. The following criteria represent the minimum requirements for acceptance by the Canadian government as a Fish Health Official.

A. EDUCATION AND EXPERIENCE

1. Bachelor's degree or equivalent in any field of fisheries or biological science and two years' experience in the diagnosis of fish diseases, including experience in bacteriological, virological, and parasitological techniques.

2. Veterinary, master's, or doctoral degree or equivalent with evidence of training in bacteriology, virology, and parasitology and one year's experience in the diagnosis of fish diseases.

B. LABORATORY FACILITIES

Laboratory facilities adequate for microbiological and parasitological evaluation of samples must be available to the proposed Fish Health Official.

C. APPLICATION PROCEDURE

To be considered for approval as a Fish Health Official, a candidate must submit a curriculum vitae, three specimen signatures, and a description of available laboratory facilities and equipment to the National Registry of Fish Diseases.

APPENDIX 4

Fish Health Certificate

Government of Canada
Fisheries and Oceans

Gouvernement du Canada
Pêches et Océans

FISH HEALTH CERTIFICATE

Certificate Expiry Date
D M Y

CERTIFICATION OF SOURCE

Name of source	Address	Telephone No.

I _____ (Print name), authorized as a Fish Health Official by the Minister of Fisheries and Oceans of Canada; certify that the source indicated above was inspected by methods approved by the Minister, and that no evidence was found for the diseases or disease agents for ☐ livefish (Schedule II) or for ☐ dead fish (Schedule III) as required by the Fish Health Protection Regulations made under the Fisheries Act of Canada.

The following notifiable disease agents (Schedule IV) and/or other fish pathogens were found:

_____

Dates of last four previous satisfactory inspections	D M Y	D M Y	D M Y	D M Y

Date of issue | Signature and address of Fish Health Official | Telephone No.

CONSIGNMENT

Departing city and country	Carrier	Bill of lading No.	Date D M Y

Anticipated port of arrival in Canada (City and Province)	Date D M Y

Date | Name and address of person receiving shipment | Telephone No.

EXPORTER'S DECLARATION

I _____ (Print name), ☐ owner ☐ manager of the above noted facility which was last inspected on _____ Date, declare that to my knowledge no disease agents listed in Schedule II of the Fish Health Protection Regulations (FHPR) have been detected according to the procedures outlined in the FHPR Manual of Compliance in this facility since the last FHPR inspection, that no introduction of fish or fish eggs from an uncertified source has been made into the facility, that the shipment described above will be derived solely from this facility, and that eggs in the shipment will be surface disinfected prior to leaving the source.

I _____ (Print name), consignor of eggs taken from wild spawners declare that these eggs will be surface disinfected and that they derive solely from the above inspected source.

This shipment consists of:

_____ kg ☐ Live ☐ Eggs _____ Species

_____ Number ☐ Dead ☐ Fish _____ Species

Date | Signature and address of owner, manager or consignor | Telephone No.

FP-0867 e (02/84)

APPENDIX 5

Fish Health Laboratory Report

Government of Canada / Gouvernement du Canada
Fisheries and Oceans / Pêches et Océans

FISH HEALTH LABORATORY REPORT

Inspection Date	D M Y
FHPR Schedule	
Investigator	
Laboratory	

A. Location Data

1. Name and address of facility	2. Type of facility	
	3. Natural water body (specify)	4. Province

B. Fish Data

Species	Fish/Eggs	Age/Stage	Number held	Number examined

Stocks introduced since last FHPR inspection

Species	Age/Stage	Number	Source

C. Water Data

1. ☐ Municipal water	2. ☐ Lake	3. ☐ Stream	4. ☐ Enclosed spring
5. ☐ Open spring	6. ☐ Well	7. ☐ Deepwell	8. ☐ Brackish water
9. ☐ Marine	10. ☐ Influent disinfection	11. ☐ Effluent disinfection	
What does effluent water drain into?		Name of watershed	

D. Disease Data

1. ☐ No pathogens detected
2. ☐ Schedule II pathogens detected

Indicate prevalence by denoting: a. carriers; b. clinical signs or c. epizootic in boxes below.

- ☐ *A. salmonicida* (furunculosis)
- ☐ KD bacterium *R. salmoninarum*
- ☐ RM bacterium *Y. ruckeri*
- ☐ VHSV
- ☐ IHNV
- ☐ IPNV
- ☐ Other replicating agents
- ☐ *M. cerebralis*
- ☐ *C. shasta*

3. Other pathogens or tumors detected (specify)

Additional comments (e.g. facility disinfection and chemicals used; egg disinfection and chemicals used; drugs/vaccines used)

Date of issue

Signature of Fish Health Official

FP-0866 e (02/84)

Publication diverse spéciale 31 (édition revisée)

Règlement sur la protection de la santé des poissons

Guide de procédures

Pêches et Océans
Fisheries and Oceans

Canada

PUBLICATION DIVERSE SPÉCIALE 31 (EDITION REVISÉE)

Règlement sur la protection de la santé des poissons Guide de procédures

Ministère des Pêches et des Océans
Direction générale de la recherche sur les pêches
Direction d'aquiculture et de la mise en valeur des ressources
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

Ottawa 1984

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1984

N° de cat. Fs 41-31/31-1984
ISBN 0-662-53060-8

On peut se procurer gratuitement cette publication en s'adressant à :

Ministère des Pêches et des Océans
Direction générale de la recherche sur les pêches
Direction d'aquiculture et de la mise en valeur des ressources
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

Publié par

Gouvernement du Canada
Pêches et Océans

Direction de l'information et des publications scientifiques

Published by

Government of Canada
Fisheries and Oceans

Scientific Information and Publications Branch

Ottawa K1A 0E6

On devra référer comme suit à cette publication :

Ministère des Pêches et des Océans. 1984. Règlement sur la protection de la santé des poissons : guide de procédures. Serv. pêches mar. Publ. div. spéc. 31 (édition revisée) : 47 p.

TABLE DES MATIERES

		Page
	RESUME	iv
I	INTRODUCTION	1
II	REGLEMENT SUR LA PROTECTION DE LA SANTE DES POISSONS	3
III	LIGNES DIRECTRICES POUR LES PRODUCTEURS	6
IV	ROLE DES INSPECTEURS SANITAIRES DES POISSONS	9
V	ROLE DE L'AGENT LOCAL DE PROTECTION DE LA SANTE DU POISSON	11
VI	TECHNIQUES D'ECHANTILLONAGE	12
VII	TRANSPORT DES ECHANTILLONS	17
VIII	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	18
IX	TECHNIQUES DE DETECTION DE CERTAINES BACTERIES PATHOGENES CHEZ LES POISSONS	19
X	TECHNIQUES DE DETECTION DES VIRUS	26
XI	TECHNIQUES DE DETECTION DE CERTAINES PARASITES	31
XII	TECHNIQUES DE DESINFECTION DES OEUFS	35
	BIBLIOGRAPHIE	37
ANNEXE 1	REGISTRE NATIONAL D'ICHTYOPATHOLOGIE	39
ANNEXE 2	ADMINISTRATIONS REGIONALES	40
ANNEXE 3	COMPETENCE DES INSPECTEURS SANITAIRES DES POISSONS	43
ANNEXE 4	CERTIFICAT DE SANTE DU POISSON	44
ANNEXE 5	ETAT PHYSIOLOGIQUE DES POISSONS : RAPPORT DE LABORATOIRE	46

RESUME

Ministère des Pêches et des Océans. 1984. Règlement sur la protection de la santé des poissons : guide de procédures. Serv. pêches mar. Publ. div. spéc. 31 (édition revisée) : 47 p.

Ce guide révisé explique l'application du Règlement sur la protection de la santé des poissons établi en vertu de la Loi sur les pêcheries du Canada. Il présente les pratiques administratives et les méthodes d'inspection à suivre ainsi que les méthodes, étape par étape, concernant la manipulation des échantillons de poisson à analyser en vue de détecter chez les salmonidés les agents pathogènes importants de type bactérien viral, et mixosporidien.

Aucun transport de poisson vers le Canada ou entre les provinces ne doit se faire sans licence. Cette dernière ne sera délivrée qu'au producteur dont les installations ont été inspectées et déclarées exemptes des agents pathogènes désignés.

Les techniques d'échantillonnage se fondent sur la probabilité de détecter un agent pathogène, prenant pour acquis qu'il existe une certaine prédominance d'agents pathogènes décelables dans la population. Le choix, le transport et la manipulation en laboratoire des échantillons y sont décrits de façon détaillée.

Les méthodes mentionnées permettent de détecter les agents pathogènes suivants : la bactérie de la maladie du rein (Renibacterium salmoninarum); la bactérie de la maladie de la bouche rouge (Yersinia ruckeri); la bactérie de la furunculose (Aeromonas salmonicida); les protozoaires causant le tournis (Myxosoma cerebralis) et la cératomyxose (Ceratomyxa shasta); les virus causant la septicémie hemorragique virale, la nécrose hématopoïetique infectieuse et la nécrose pancréatique infectieuse; et d'autres organismes pathogènes qui doivent être déclarés.

I INTRODUCTION

L'avenir de la pisciculture, de la pêche sportive et de la pêche commerciale repose, au Canada, sur la santé des stocks de poisson. Le transport à l'étranger et entre les provinces des espèces d'élevage connaît une expansion rapide, ce qui favorise la propagation de maladies infectieuses graves, par exemple celle du tournis en Amérique du Nord. Des programmes efficaces de prévention et de surveillance se révèlent donc nécessaires afin d'empêcher la dissémination des agents pathogènes des poissons et ainsi atténuer l'important obstacle qu'elle oppose à la mise en valeur de ces types de pêches. Ce guide révisé de procédures a pour but d'expl.quer la mise en application du Règlement sur la protection de la santé des poissons établi en vertu de la Loi sur les pêcheries du Canada. Il présente des lignes directrices pour les producteurs, définit le rôle des inspecteurs sanitaires des poissons et celui des agents locaux de protection de la santé des poissons et fixe des méthodes d'échantillonnage, de manutention et de diagnostic à utiliser lors des inspections faites aux fins de la délivrance de certificats.

Le Règlement sur la protection de la santé des poissons figure à la section II, tel qu'il est publié dans la Gazette du Canada. Il s'applique à toutes les espèces de poisson appartenant à la famille des salmonidés des genres énumérés à l'annexe I. Le règlement vise à empêcher la propagation d'agents pathogènes infectieux grâce à l'inspection des installations de production de stocks de poisson, et à contrôler les déplacements des poissons contaminés. Il s'applique aux poissons d'élevage vivants et morts, aux oeufs (y compris tout produit sexuel fécondé ou non fécondé) de poissons sauvages et d'élevage et aux produits de poissons d'élevage morts (y compris les produits fumés à froid, mais non les produits en conserve traités à la chaleur) destinés à entrer au Canada ou à traverser les limites provinciales à l'intérieur du pays. Les procédures de saisie et autres pouvoirs prévus par la Loi sur les pêcheries s'appliquent aussi à toute infraction au Règlement.

En vertu du règlement, quatre inspections satisfaisantes consécutives sur une période d'au moins 18 mois doivent être effectuées à une installation avant l'octroi du certificat. Les inspections doivent être effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours au cours de la période précédant l'octroi du certificat. Une nouvelle installation utilisant une source d'eau isolée exempte de toute espèce de poisson, débutant avec des stocks provenant d'une installation certifiée, peut obtenir un certificat après une seule inspection positive. Pour qu'une installation de production conserve son certificat, des inspections satisfaisantes consécutives doivent être effectuées deux fois l'an à des intervalles d'environ six mois (pas moins de 90 jours ni plus de 270 jours). Des inspections doivent être faites au cours du printemps et de l'automne, la dernière inspection ne remontant pas à plus de 270 jours avant la date d'entrée d'un envoi de poissons dans une province. Les procédures données dans le guide doivent être suivies.

Le concept de «zonage» peut être introduit sur la base d'informations détaillées concernant l'absence d'agents pathogènes dans des secteurs précis. L'identification de certaines «zones» exemptes de bactéries pathogènes pourrait mener à une modification des exigences en matière d'inspection dans les installations de production. Le concept de zonage sera seulement appliqué aux installations qui exportent des poissons d'élevage morts.

Pour tout éclaircissement concernant l'interprétation du présent règlement, veuillez communiquer avec le responsable du Registre national d'ichtyopathologie, ministère des Pêches et des Océans, Ottawa (Ontario), K1A 0E6, téléphone : (613) [redacted] ou télex 0534228.

990-0276

II REGLEMENT SUR LA PROTECTION DE LA SANTE DES POISSONS

Titre abrégé

1. Ce règlement peut s'intituler : Règlement sur la protection de la santé des poissons.

Interprétation

2. Dans ce règlement,

«agent local de protection de la santé du poisson» désigne une personne approuvée comme agent local de protection de la santé du poisson et chargée de l'administration et de l'application de ce règlement; (Local Fish Health Officer)
«approuvé» signifie approuvé par le ministre; (approved)
«certificat» désigne un certificat visé à l'article VI; (certificate)
«importer» signifie introduire dans toute province du Canada des produits en provenance de l'étranger ou d'une autre province du Canada; (import)
«inspecteur sanitaire des poissons» désigne une personne approuvée pour inspecter le poisson et les sources de poisson aux fins de ce règlement; (Fish Health Official)
«licence d'importation» désigne une licence visée à l'article 4; (import permit)
«Ministre» désigne le ministre des Pêches; (Minister)
«poisson d'élevage» désigne un poisson visé à l'annexe I, introduit par l'homme dans un établissement piscicole, et comprend les oeufs de ce poisson; (cultured fish)
«poisson sauvage» désigne un poisson visé à l'annexe I, autre que le poisson introduit par l'homme dans un établissement piscicole; (wild fish)

Interdiction

3. Il est interdit d'importer du poisson d'élevage ou des oeufs de poisson sauvage sans une licence d'importation.

Licences

4. Sous réserve de l'article 5, un agent local de protection de la santé du poisson d'une province, peut délivrer une licence d'importation à quiconque en fait la demande, l'autorisant ainsi à importer du poisson d'élevage ou des oeufs de poisson sauvage dans cette province.

5. Aucune licence d'importation ne sera délivrée à moins que

a) la personne qui en fait la demande n'ait obtenu un certificat;

b) l'agent local de protection de la santé du poisson soit convaincu qu'aucune maladie ni aucun agent pathogène visé à l'annexe IV et apparaissant sur le certificat conformément au paragraphe 6(2), ne nuira à la protection ou à la conservation du poisson dans la province d'importation.

Certificats

6. (1) Le certificat visé à l'alinéa 5a) sera délivré par l'inspecteur sanitaire des poissons et certifié,

a) pour les poissons d'élevage vivants,
   (i) que le poisson provient d'une source inspectée d'une manière approuvée et exempte de toute aucune maladie et de tout agent pathogène visé à l'annexe II, et
   (ii) qu'aucun poisson, autre qu'un poisson provenant de la ressource visée au sous-alinéa (i), n'a été introduit dans la source d'importation au cours des deux années précédant la date de délivrance du certificat;
b) pour les oeufs de poisson sauvage, que les oeufs proviennent de poissons sauvages inspectés d'une manière approuvée et qui n'étaient porteurs d'aucune maladie ni d'aucun agent pathogène visé à l'annexe II; ou
c) pour les poissons d'élevage morts, que le poisson provient d'une source inspectée d'une manière approuvée et exempte de toute maladie et de tout agent pathogène visé à l'annexe III.

(2) Le certificat visé à l'alinéa (1)a), pour le poisson d'élevage vivant, ou à l'alinéa (1)b) pour les oeufs de poisson d'élevage, indique la présence de toute maladie ou de tout agent pathogène visé à l'annexe IV dépisté chez le poisson au cours de l'inspection visée à ces alinéas.

ANNEXE I

POISSONS

Toutes les espèces et hybrides provenant des espèces de poisson appartenant à la famille des salmonidés, y compris les genres suivants :

Saumon du Pacifique	Oncorhynchus spp
Saumon du Danube et Taïmen	Hucho spp
Saumon de l'Atlantique	Salmo spp
Truite	Salmo spp
Omble	Salvelinus spp
Ombre	Thymallus spp
Lenok	Brachymystax spp
Inconnu	Stenodus spp
Corégone	Coregonus spp
Ménomini	Prosopium spp
Ayu	Plecoglossus spp

ANNEXE II

MALADIES OU AGENTS PATHOGENES TROUVES
CHEZ LES POISSONS VIVANTS OU DANS LEUR SOURCE

1. Tout agent de réplication filtrable susceptible de causer des effets cytopathologiques dans les cultures cellulaires du poisson indiquées par le ministre et comprenant, entre autres, les affections suivantes :
   a) Septicémie hémorragique virale (Egtved) (virus Egtved, SHV)
   b) Nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI)
   c) Nécrose pancréatique infectieuse (NPI)
2. Tournis (Myxosoma cerebralis)
3. Cératomyxose (Ceratomyxa shasta)
4. Furonculose (Aeromonas salmonicida)
5. Maladie bactérienne du rein (bactérie de la maladie du rein)
6. Maladie bactérienne de la bouche rouge (bactérie de la bouche rouge)

ANNEXE III

MALADIES OU AGENTS PATHOGENES TROUVES
CHEZ LES POISSONS MORTS OU DANS LEUR SOURCE

1. Septicémie hémorragique virale (Egtved)(Virus Egtved SHV)
2. Tournis (Myxosoma cerebralis)

ANNEXE IV

MALADIES OU AGENTS PATHOGENES TROUVES
CHEZ LES POISSONS VIVANTS OU DANS LEUR SOURCE

1. Infections myxobactériennes
2. Septicémie à aéromonades motiles (Aeromonas sp motile)
3. Septicémie à pseudomonades (Pseudomonas spp)
4. Vibriose (Vibrio spp)

III LIGNES DIRECTRICES POUR LES PRODUCTEURS

Le règlement s'applique à toutes les installations d'où proviennent des poissons d'élevage vivants et morts, des oeufs de poissons sauvages et d'élevage, ainsi que des produits de poissons d'élevage morts (y compris des produits fumés à froid mais non des produits en conserve traités à la chaleur) de toutes les espèces appartenant à la famille des salmonidés mentionnées à l'annexe I qui seront envoyées au Canada ou transférées d'une province à une autre. Les «installations» comprennent tous les endroits servant à la propagation ou à l'exploitation d'oeufs et/ou de poissons.

Une licence d'importation est obligatoire pour tout envoi de poisson ou d'oeufs désigné ci-dessus, à l'exception d'envois entre les provinces de poissons d'élevage morts au Canada. Ces licences ne peuvent être accordées qu'aux producteurs qui peuvent fournir la preuve que les conditions sanitaires de leur installation ont été certifiées après inspection de leurs stocks de poisson par un inspecteur sanitaire des poissons autorisé. Les producteurs doivent se familiariser avec tous les règlements de la région où ils prévoient importer le poisson puisqu'il peut exister des exigences autres que celles du Règlement sur la protection de la santé des poissons.

On peut obtenir une liste des inspecteurs sanitaires des poissons autorisés à délivrer des certificats en s'adressant au Registre national d'ichtyopathologie, du ministère des Pêches et des Océans; cependant, les producteurs canadiens désireux d'obtenir un certificat doivent s'adresser directement à l'autorité qui leur a accordé leur permis d'exploitation.

Au Canada, le producteur qui désire obtenir un certificat pour son installation de production doit, aux fins de l'inspection, fournir à ses frais le poisson. Les espèces de poisson, autres que celles énumérées à l'annexe I, que le producteur élève dans son installation sont également soumises à un échantillonnage par l'inspecteur sanitaire des poissons. Le ministère des Pêches et des Océans assumera le coût de ces inspections au Canada pour autant qu'elles touchent les producteurs commerciaux qui expédient du poisson à l'extérieur de la province pour laquelle ils détiennent un permis. A l'extérieur du Canada, le producteur doit obtenir un certificat à ses propres frais en faisant appel à des inspecteurs sanitaires des poissons approuvés par le ministre. L'inspecteur sanitaire des poissons peut à son gré déterminer la période et la fréquence de l'échantillonnage et choisir les poissons; il doit avoir accès aux registres où sont consignés les introductions, les pertes, la fréquence des maladies et les traitements.

Si une installation de production titulaire d'un certificat reçoit du poisson ou des oeufs d'une source non certifiée, y compris des espèces non énumérées à l'annexe I, ou si un quelconque agent pathogène inscrit à l'annexe II du Règlement est découvert dans l'installation, cette dernière verra son certificat annulé et devra se soumettre à un programme d'inspection de deux ans avant d'obtenir un

nouveau certificat. Avant de commencer un tel programme, le producteur doit démontrer qu'il a pris les mesures adéquates pour éliminer les maladies réelles ou éventuelles. Si une installation certifiée reçoit du poisson ou des oeufs d'une autre source certifiée, son certificat ne sera pas touché, mais le producteur doit être prêt à fournir, sur demande, un registre de ces introductions. Une nouvelle installation de production située à proximité d'une source d'eau isolée et exempte de toute espèce de poisson peut recevoir un certificat après une seule inspection positive si le stock de cet établissement provient d'un autre établissement certifié. Après cette première inspection, l'établissement conserve son certificat tant et aussi longtemps que les inspections continues seront satisfaisantes.

Il est nécessaire d'obtenir, avant l'envoi, une licence d'importation délivrée par l'agent local de protection de la santé du poisson de la province à laquelle l'envoi est destiné. Une licence d'importation doit accompagner tout envoi de poisson. L'annexe II donne une liste des bureaux où l'on peut rejoindre les agents locaux de protection de la santé du poisson.

Pour obtenir une licence d'importation, les producteurs doivent présenter un exemplaire signé du certificat de santé du poisson (annexe IV) attestant que nul poisson autre que ceux qui proviennent d'un établissement certifié ou de stocks sauvages certifiés, y compris les espèces non énumérées à l'annexe 1, n'a été introduit dans leur installation durant la période visée par le certificat. Le producteur qui demande un permis d'importation doit également déclarer qu'aucun agent pathogène désigné n'a été trouvé dans l'installation depuis la dernière inspection.

La licence d'importation autorise un transport direct du poisson d'une installation certifiée à sa destination. Le fait de remplir d'eau un camion ou tout autre contenant servant à l'envoi dans un endroit autre qu'un établissement certifié ou à partir d'une source d'eau isolée exempte de toute espèce de poisson équivaut à introduire dans une installation du poisson provenant d'une source non certifiée, et rend nulle la licence d'importation.

Bien que le règlement ne le stipule pas expressément, la désinfection superficielle des oeufs avant tout envoi est fortement recommandée, sauf indication contraire. La Section XII du présent guide propose un procédé de désinfection.

Certains sujets de préoccupation pour les producteurs spécialisés peuvent nécessiter quelques éclaircissements. Les envois de poissons morts des lacs des Prairies où le taux de mortalité est toujours élevé à cause des rigueurs de l'hiver constituent un cas particulier : ils peuvent être envoyés sans inspection a) s'ils provenaient d'une source certifiée quand ils ont servi au repeuplement du lac, b) si aucune maladie infectieuse manifeste ne s'est développée pendant la période de croissance et c) si les lacs en question n'ont aucun antécédent de contamination par l'un ou l'autre agent pathogène mentionné à l'annexe III. Si toutes ces conditions ne peuvent être remplies, il faut obtenir pour ces lacs un certificat attestant qu'ils ne contiennent

aucun des agents pathogènes mentionnés à l'annexe III et ce, avant l'envoi du poisson mort. S'il s'agit d'un envoi de poissons vivants, il faut obtenir pour ces lacs un certificat attestant qu'ils ne contiennent aucun des agents pathogènes mentionnées à l'annexe II. La délivrance du certificat doit se fonder sur les résultats des inspections de poissons provenant des lacs en question et faites à l'époque, ou à peu près, des prélèvements de poissons.

Il peut arriver qu'un inspecteur sanitaire des poissons souhaite modifier les procédures d'inspection dans certaines circonstances. Les précédents en cette matière peuvent lui être communiqués par le responsable du Registre national d'ichtyopathologie.

Dans certains cas, les laboratoires chargés d'établir les diagnostics sur l'état pathologique du poisson seront situés dans une autre province que celle où a eu lieu l'inspection, nécessitant ainsi le transport des échantillons de poisson de part et d'autre des limites provinciales. De tels échantillons doivent être manipulés de façon à éviter toute contamination. Toute personne oeuvrant dans le domaine de la recherche sur les pêches doit se conformer aux exigences et aux termes du Règlement et être au courant des exigences régionales.

IV ROLE DES INSPECTEURS SANITAIRES DES POISSONS

L'inspecteur sanitaire des poissons doit être un spécialiste ayant la compétence voulue pour diagnostiquer les maladies du poisson; il doit avoir accès à un laboratoire permettant d'établir un diagnostic selon les méthodes mentionnées dans le guide et avoir reçu l'autorisation du gouvernement du Canada (annexe 3). Ceux qui veulent obtenir cette autorisation doivent communiquer avec le responsable du Registre national d'ichtyopathologie; il leur faut fournir une copie de leur curriculum vitae, trois spécimens de leur signature et une description de leur compétence en laboratoire. Un groupe de spécialistes des maladies étudiera toutes les demandes et fera connaître aux candidats les résultats de la sélection. S'il est prouvé qu'un inspecteur sanitaire des poissons autorisé ne respecte pas l'esprit du Règlement, c.-à-d. empêcher la propagation d'agents pathogènes infectueux en inspectant soigneusement les sources de production et en contrôlant le transport des stocks contaminés, en ne tenant pas compte délibérément soit des exigences en matière d'inspection ou des résultats des inspections, il sera suspendu ou rayé de la liste des inspecteurs autorisés.

L'inspecteur sanitaire des poissons effectue une inspection en se rendant sur les lieux de production, en en visitant tous les secteurs et en suivant les procédures mentionnées aux Sections VI-XI du présent guide. L'inspecteur devrait obtenir du propriétaire ou du responsable de l'établissement des renseignements sur l'identification des stocks à inspecter et étudier les registres des introductions, des pertes, de la fréquence des maladies et du traitement du poisson dans l'établissement au cours des deux dernières années ou depuis la date de délivrance du premier certificat. Si l'installation répond à toutes les exigences du Règlement et si les échéances des inspections ont été respectées, l'inspecteur sanitaire des poissons peut délivrer un Certificat de santé du poisson (annexe 4), lequel doit être distribué de la façon suivante :

Copie blanche - au propriétaire ou au responsable; une exemplaire de cette dernière doit accompagner chaque demande de licence d'importation

Copie jaune - au responsable du Registre national d'ichtyopathologie

Copie rose - à l'inspecteur sanitaire des poissons pour ses dossiers.

Si les inspecteurs sanitaires des poissons détiennent des renseignements diagnostiques recueillis lors d'un échantillonnage effectué en dehors de périodes désignées du printemps et de l'automne, ou des renseignements diagnostiques étayés provenant d'autres sources fiables, ils doivent les utiliser, avec ceux qui ont été recueillis durant les périodes désignées, pour déterminer l'état de santé des poissons et délivrer des certificats.

De plus, les inspecteurs sanitaires des poissons au Canada doivent remplir en trois exemplaires un rapport de laboratoire sur l'état physiologique des poissons (annexe 5), envoyer la copie jaune

au Registre national d'ichtyopathologie, la copie blanche au propriétaire ou au responsable, laquelle sert de preuve d'inspection, et garder la copie rose pour leur dossier. Les rapports de laboratoire sur l'état physiologique des poissons des installations situées à l'extérieur du Canada n'ont pas à être envoyés au responsable du Registre national, bien que l'acheteur puisse avoir besoin des résultats de l'analyse de laboratoire à la suite de laquelle a été délivré le certificat.

S'il est nécessaire d'annuler le certificat d'une installation parce que celle-ci n'a pas respecté les diverses exigences de l'inspection, soit parce qu'on a décelé des bactéries pathogènes énumérées à l'annexe II ou à cause de l'introduction de stocks d'une source non certifiée, l'inspecteur sanitaire des poissons doit alors appliquer les procédures suivantes : des copies du rapport de laboratoire sur l'état physiologique des poissons dûment remplies, une lettre indiquant les raisons pour révoquer le certificat et les étapes nécessaires pour qu'un certificat soit de nouveau délivré doivent être envoyées au producteur et au Registre national d'ichtyopathologie.

Les étapes minimales nécessaires pour qu'une installation soit de nouveau certifiée sont les suivantes :

a) Tous les lots où un agent pathogène mentionné à l'annexe II a été décelé doivent être enlevés de l'établissement.
b) Les unités d'élevage d'où ces lots ont été enlevés doivent être traitées en suivant les procédures établies pour éliminer les agents pathogènes.
c) L'installation doit subir quatre inspections consécutives satisfaisantes au cours d'une période d'une durée d'au moins 18 mois, à des intervalles d'au moins 90 jours et de 270 jours au maximum entre les inspections.

V ROLE DES AGENTS LOCAUX DE PROTECTION DE LA SANTE DU POISSON

Les agent locaux de protection de la santé du poisson, qui se trouvent dans chaque région du Canada, veillent à la mise en application du réglement dans leur province ou leur région. Leurs responsabilités comportent entre autres l'examen des certificats et des données relatives à une source de protection donnée, à un envoi particulier de poisson ou d'oeufs, et aux exigences de leur région sur le plan de la santé des poissons. Conformément à l'article 5 du réglement, ils peuvent délivrer des licences d'importation aux personnes qui en font la demande afin d'autoriser le passage d'envois acceptables de poissons vivants ou d'oeufs entrant au Canada ou transportés entre les provinces du Canada et de poissons morts entrant au Canada aux points frontaliers. Chaque envoi doit être accompagné d'une licence. Le présent guide ne prévoit pas l'utilisation d'une licence d'importation normalisée étant donné que les provinces ou les régions ont élaboré leur propre licence en vue de répondre à leurs besoins particuliers.

Les agents pathogénes à déclarer mentionnés à l'annexe IV ne sont pas énumérés à l'annexe II ou III mais sont considérés comme importants selon l'inspecteur sanitaire des poissons. Dans des cas particuliers, il peut y avoir des raisons qui justifient la décision de l'agent local de protection du la santé du poisson d'empêcher l'importation de ces agents pathogénes à déclarer ou d'autres organismes contaminant les poissons dans une région donnée.

Les bureaux des agents locaux de protection de la santé du poisson sont mentionnés à l'annexe 2.

VI TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGE

A. POISSON D'ELEVAGE

1. Echantillonnage par lots

Sauf indication contraire (voir VI B 1), l'échantillonnage des poissons se fait par lots. Un lot se définit comme suit : poissons du même âge qui ont toujours partagé le même approvisionnement en eau et qui proviennent d'une population donnée de reproducteurs. Dans les situations où cette définition de lots ne peut être appliquée, c'est à l'inspecteur sanitaire des poissons de décider lui-même s'il y a lieu de diviser le poisson en lots.

2. Sélection des échantillons

La façon de déterminer le nombre exact de poissons qu'il faut prélever d'un lot donné est basée sur la recherche d'une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans un lot pour lequel on suppose que le taux d'infection décelable est de 5 ou 10 % (tableau 1). Il est important de noter que certains agents pathogènes quand ils se trouvent à l'état de porteurs sont très difficiles à déceler. L'inspecteur sanitaire des poissons et le producteur doivent être avertis de cette possibilité. Les probabilités statistiques indiquées dans le tableau I peuvent ne pas s'appliquer à de telles situations. Les échantillons doivent être prélevés sous la surveillance de l'inspecteur sanitaire des poissons d'une façon et à une période offrant la plus grande possibilité de déceler la présence d'un agent pathogène. Lorsque l'échantillon est prélevé d'un lot gardé dans une seule unité

TABLEAU I. Nombre d'échantillons requis pour déceler un ou plusieurs spécimens contaminés dans des populations (lots) dont on présume que le taux minimum d'infection décelable est de 5 et 10 %. Les calculs sont basés sur un niveau de confiance de 95 %. Pour les populations intermédiares, on doit prendre le nombre d'échantillons indiqué sur la ligne suivante. (D'après Ossiander et Wedemeyer, 1973.)

Taille de la population	Nombre de poissons à échantillonner si l'on présume que l'incidence d'infection décelable est de :	
	5 %	10 %
50	29	20
100	43	23
250	49	25
500	54	26
1,000	55	27
2,500	56	27
5,000	57	27
10,000	57	27
100,000	57	27
Plus de 100,000	60	30

(par exemple réservoir, canal, ou étang), l'échantillon sélectionné doit comporter autant de spécimens moribonds et fraîchement morts qu'il y en a de disponibles. Si le lot de poisson ci-haut mentionné est gardé dans plus qu'une unité, le nombre total de spécimens à prélever serait le même que précédemment. Cependant, les spécimens qui doivent être prélevés des unités individuelles le seront en nombre tel qu'il reflétera la proportion du lot retenu dans chacune des unités. Là encore, l'échantillon provenant d'une unité donnée doit comprendre autant de poissons moribonds et fraîchement morts qu'il est possible. Si d'autres poissons sont nécessaires pour compléter l'échantillon, des poissons d'apparence saine peuvent alors être prélevés, ou l'inspecteur sanitaire des poissons peut choisir de revenir en deçà d'une période de 30 jouirs pour compléter le prélèvement du nombre requis de poissons.

Les échantillons ne doivent pas être prélevés au cours du traitement ou immédiatement après. Une documentation de base complète doit être obtenue pour tous les échantillons. Cela comprend les données ayant trait à toute utilisation récente de substances chimiothérapiques, aux antécédents sanitaires de l'installation et aux lots d'où proviennent les échantillons.

Dans le cas où des symptômes manifestes de maladies sont notés lors de l'échantillonnage, les techniques de détection d'agents pathogènes à déclarer et d'autres organismes pathogènes doivent être utilisés en plus des techniques d'identification des agents pathogènes mentionnés à l'annexe II.

Lorsqu'il faut traiter des échantillons de poisson ou de leur tissu en groupes plutôt qu'individuellement comme dans le cas des analyses virologiques, on doit prendre soin de traiter séparément les poissons d'apparence saine des spécimens moribonds ou récemment morts.

3. Nombre d'échantillons pour la recherche des virus

a) Les poissons d'élevage (non reproducteurs) : le nombre d'échantillons à prélever est celui qui offre une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans un lot, en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum.

b) Les reproducteurs (poissons arrivés à maturité sexuelle qui servent à la reproduction) : on doit viser à la même sensibilité pour la détection des individus contaminés. L'échantillonnage doit être effectué une fois par an à l'époque de la fraie. Chez les espèces qui ne se reproduisent qu'une fois, les échantillons de tissus doivent être prélevés chez tois les poissons concernés jusqu'à un maximum de 60. Pour les espèces qui se reproduisent plusieurs fois, 10 %[1] de tous les reproducteurs utilisés, jusqu'à un maximum de 30 poissons, doivent être soumis à un

[1]L'échantillonnage létal de seulement 10 % de tous les reproducteurs ne correspond au taux d'échantillonnage exposé au Tableau 1; cet echantillonnage vise à conserver des populations petites mais intéressantes de reproducteurs qui peuvent vivre et se reproduire à nouveau.

échantillonnage létal. Le reste des échantillons nécessaires pour obtenir le taux qui offre une probabilité de 95 % de déceler un poisson contaminé dans un lot dont on présume que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum, doit être constitué de liquide de reproduction. Le liquide ovarien doit constituer le plus grand nombre possible des échantillons de produits reproducteurs recueillis.

4. Taille des échantillons pour la recherche de bactéries

a) Les poissons d'élevage doivent être échantillonnés, pour la présence d'organismes pathogènes bactériens selon un taux qui offre une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans un lot en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum. Pour fins d'études bactériologiques de routine, il faut échantillonner seulement les poissons dont la longueur à la fourche est en moyenne d'au moins 4 cm. Techniquement, il est plus difficile de faire un échantillonnage bactériologique valable des poissons qui sont plus petits. Il est toutefois possible de s'en servir lorsqu'on observe des taux de mortalité ou des symptômes de maladie inhabituels et inexplicables.

b) Les reproducteurs doivent être échantillonnés pour la présence de bactéries conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage virologique létal de cette catégorie (voir VI A 3b).

5. Taille des échantillons pour la recherche de parasites

a) En ce qui concerne Myxosoma cerebralis et Ceratomyxa shasta, il faut échantillonner les poissons d'élevage à un taux qui offre une probabilité de 95 % qu'un poisson contaminé sera décelé dans un lot en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum.

M. cerebralis : le poisson doit avoir au moins 120 jours pour que les analyses soient significatives, étant donné que les spores sur lesquelles se base le diagnostic se développent lentement. Chez les poissons élevés gardés à des températures inférieures à 12°C, la formation de spores peut prendre de 9 à 11 mois (Taylor et al. 1973).

C. shasta : une surveillance régulière des poissons d'apparence saine, afin de trouver des spores, doit se faire seulement sur les poissons qui sont âgés en moyenne d'au moins 120 jours. On doit examiner des poissons plus jeunes pour déceler C. shasta seulement lorsque des taux de mortalité ou des symptômes de maladies inhabituels et inexplicables se manifestent.

b) Les reproducteurs doivent être échantillonnés conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage virologique létal des reproducteurs (voir VI A 3b).

6. Périodes d'échantillonnage et fréquence

a) Poissons d'élevage : l'échantillonnage devra se faire au moins deux fois l'an, les périodes d'échantillonnage et la fréquence dépendant des conditions locales et de la décision de l'inspecteur sanitaire des poissons. Parce que la détection de M. cerebralis et de certains virus se réalise mieux lorsque les poissons ont un certain âge, on recommande que les périodes d'échantillonnage se situent aux printemps et à l'automne (de mars à mai et de septembre à novembre).

b) Reproducteurs : l'échantillonnage sera effectué une fois l'an pendant la fraie (voir VI A 3 b).

B. POISSONS SAUVAGES

1. Poissons non arrivés à maturité sexuelle

Tous les poissons sexuellement non développés capturés à l'état sauvage doivent être échantillonnés à un taux qui donnera une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans tous les poissons capturés en supposant que le taux de contamination est de 5 % au minimum. Ce taux d'échantillonnage s'appliquera aux divers agents pathogènes (virus, bactéries et myxosporides) mentionnés précédemment. C'est à l'inspecteur sanitaire des poissons qu'il revient de décider quelle sera le nombre de poissons sauvages à échantillonner.

2. Poissons arrivés à maturité sexuelle

S'il faut recueillir des reproducteurs sauvages ou leurs oeufs fécondés, il importe de prélever du liquide séminal et ovarien de tous les poissons concernés jusqu'à un maximum de 60 poissons. Chez les espèces pour qui ne se reproduisent qu'une fois, des échantillons de tissus doivent être prélevés sur tous les poissons concernés (échantillonnage létal) jusqu'à un maximum de 60. Pour les espèces qui se reproduisent plusieurs fois, 10 %[2] de tous les reproducteurs utilisés ou recueillis, jusqu'à un maximum de 30 poissons, doivent être soumis à un échantillonnage létal. Ces taux d'échantillonage s'appliquent aux divers agents pathogènes (virus, bactéries et myxosporidies) cités plus tôt. De nouveau, d'est à l'inspecteur sanitaire des poissons que revient la décision lorsqu'il octroie un certificat pour des stocks sauvages.

---

[2]Voire note 1.

C. OEUFS FECONDES ET PRODUITS SEXUELS

On ne peut se fier à l'échantillonnage d'oeufs fécondés ou aux produits sexuels des poissons pour déceler les agents pathogènes mentionnés à l'annexe II. La menace que constituent de tels oeufs ou produits sexuels pour la santé des poissons doit donc être évaluée à la lumière des antécédents des reproducteurs.

D. ESPECES AUTRES QUE DES SALMONIDES

D'autres espèces n'appartenant pas à la famille des salmonidés et se trouvant dans la même installation que les espèces de salmonidés doivent être échantillonnés par l'inspecteur sanitaire des poissons pour déceler la présence des agents pathogènes énumérés à l'annexe II ou III.

VII TRANSPORT DES ECHANTILLONS

Les échantillons de poissons doivent être manipulés rapidement de manière à ce que la dégénérescence ne rende le diagnostic incertain ou impossible. Si les échantillons ne peuvent être apportés vivants au laboratoire, il faut les garder sur la glace ou les réfrigérer pendant 48 h au maximum.

A. POISSONS VIVANTS

Les poissons vivants devraient être transportés dans des sacs de plastique hermétiques remplis d'eau et d'oxygène. On peut ensuite laisser ces sacs avec de la glace dans des contenants isolés. Dans ces conditions, il n'est ordinairement pas nécessaire d'anesthésier les poissons.

B. POISSONS MORTS

Les poissons échantillonnés doivent être placés dans des sacs de plastique hermétiques (les poissons morts ou moribonds doivent être séparés des poissons sains) qui sont placés dans un contenant isolé, chaque sac étant entouré d'une couche de glace.

C. LIQUIDES DE REPRODUCTION

Les échantillons de liquides séminal et ovarien doivent être transportés dans des contenants hermétiques renfermant de la glace. Ne pas mélanger les échantillons de liquide séminal et ovarien. Quant aux restrictions de regroupement, voir X B 4 b et X C.

VIII TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

A. TECHNIQUE D'AUTOPSIE

1. Généralités

La technique décrite ci-dessous a été mise au point dans le but de faciliter l'analyse d'un grand nombre de poissons quant à la présence des agents pathogènes déjà nommés. Sauf dans le cas de très petits spécimens, le même poisson servira de source de tissus pour les diverses analyses bactériologiques, virologiques et la recherche de myxosporidies. L'analyse bactériologique doit être effectuée en premier. Pour maximiser la sensibilité de la détection, les poissons doivent être autopsiés en deçà de 48 h de l'échantillonnage et toutes les analyses doivent être effectuées au cours de cette période.

2. Examen externe et échantillonnage

Prendre note de toutes les anomalies macroscopiques telles que la décoloration du corps, la dilatation du corps, l'exophthalmie, les ulcères, les ampoules, l'inflammation, les zones hémorragiques, les branchies nécrosées ou en forme de massue, ainsi que l'érosion des opercules, des nageoires et des pédoncules caudaux. Inoculer les milieux appropriés et préparés des frottis colorés avec les tissus provenant de ces lésions.

3. Examen interne et échantillonnage

Désinfecter la surface du poisson et, à l'aide d'instruments aseptiques, exposer le rein. Inoculer les milieux appropriés et préparer les frottis appropriés avec du tissu rénal.

Examiner les éventuelles anomalies des viscères. Inoculer les milieux appropriés et préparer des frottis avec les tissus des organes anormaux. Enlever les tissus devant servir aux analyses virologiques et à la recherche de myxosporidies.

B. DESTRUCTION DES ECHANTILLONS

Le laboratoire d'expertise devrait manipuler et jeter les échantillons et tout autre matériel susceptibles d'être contaminés de manière à empêcher la propagation d'agents pathogènes. Tout le matériel, comme les carcasses de poisson ou les tissus, les contenants servant au transport, l'eau, les cultures microbiennes et l'équipement contaminé doit être autoclavé, incinéré ou alors stérilisé avant d'être jeté.

IX TECHNIQUES DE DETECTION DE CERTAINES BACTERIES PATHOGENES CHEZ LES POISSONS

A. BUT

Les micro-organismes concernés par ces techniques de détection se divisent en trois catégories :

1. Les bactéries pathogènes (énumérées à l'annexe II) dont la distribution géographique est supposée limitée et dont l'absence doit être vérifiée. Elles comprennent les agents pathogènes à certifier suivants :
   Renibacterium salmoninarum (bactérie de la maladie du rein)
   Yersinia ruckeri (maladie entérique de la bouche rouge)
   Aeromonas salmonicida (furonculose)

2. Les bactéries pathogènes (mentionnées à l'annexe IV) qui peuvent être ubiquistes et qui si elles sont détectées durant une épidémie ou de façon systématique dans les poissons échantillonnés en l'absence de signes cliniques, doivent être déclarées. Elles comprennent :
   Motile Aeromonas spp. (par ex., Aeromonas hydrophila)
   Pseudomonas spp. (par ex., Pseudomonas fluorescens)
   Vibrio spp. (par ex., Vibrio anguillarum)
   Myxobactéries - (par ex., Flexibacter columnaris)

3. Les bactéries non énumérées à l'annexe II et IV, que l'inspecteur sanitaire des poissons détecte et qu'il détermine être associées à des pertes importantes ou à des symptômes de maladies (par ex., Edwardsiella tarda).

B. MODES DE DETECTION

Les modes de détection qui suivent représentent les exigences minimales pour les analyses bactériologiques. Ils doivent être appliqués à tous les échantillons prélevés de lots où il y a une prédominance habituellement élevée de signes de maladies et/ou de mortalité. Quant aux échantillons qui viennent de lots d'apparence saine, ces modes de détection s'appliquent seulement aux poissons dont la longueur en moyenne à la fourche est de 4 cm et plus (voir VI A 4a).

1. Prélever en conditions aseptiques les tissus suivants et les ensemencer par stries sur le milieu approprié :
   a) le tissu rénal, prélevé de préférence de parties qui semblent anormales, et les tissus de lésions externes et internes sur la gélose trypticase - soya (TSA);
   b) tissu de branchies ou tissus de lésion externe sur milieu de Shieh (gélose SH) ou gélose Cytophaga (CA) seulement si la pathologie macroscopique suggère une infection myxobactérienne.

2. Préparer des frottis de tissu rénal et de tissus lésés et effectuer une coloration de Gram et examiner un minimum de 25 champs (grossissement de 900 à 1000X). Avec la présence fréquente de petits diplobacilles Gram-positif, à l'intérieur des cellules, on peut supposer la présence de R. salmoninarum (Sanders et Fryer 1980). (L'absence de croissance sur le milieu TSA renforce la présomption).

3. Incuber les boîtes de Pétri contenant le milieu TSA à 20°C pendant cinq jours et les examiner quotidiennement pour y déceler tout signe de multiplication. Incuber les boîtes de milieu SH ou CA à 15-20°C pendant cinq jours et les examiner chaque jour pour y déceler tout signe de multiplication.

4. Si une pathologie macroscopique suggère une infection myxobactérienne, préparer des lames humides de tissu branchial ou de tissus lésés et les examiner pour y déceler la présence de masses de bâtonnets longs et minces. Choisir des colonies jeunes et représentatives (jaunes, sèches, rhizoïdes ou jaunes, humides, qui s'étalent) provenant de boîtes de milieu SH ou CA, préparer des frottis et effectuer une coloration gram. La présence de bâtonnets à Gram-négatif longs et minces, mobiles qui glissent ou «rampent» indique vraisemblablement la présence de myxobactéries.

5. A partir des cultures sur milieu TSA, sélectionner de jeunes colonies représentatives. Différencier les micro-organismes d'après les caractéristiques suivantes :

   a) Si les cellules sont des bâtonnets à Gram-négatif, oxydase-positifs, non mobiles, qui font fermenter la glucose (test O.F.) et produisent habituellement un pigment brun diffus, l'isolat est vraisemblablent A. salmonicida (Griffin et al. 1952). Il peut y avoir des souches achromogènes d'A. salmonicida (Evelyn 1971).
   b) Si les cellules sont des bâtonnets à Gram-négatif, à oxydase, indole et H_2S-négatifs, et produisent une réaction alcaline/acide (K/A) sur milieu TSI (trois sucres + fer), on peut supposer que l'isolat est Y. ruckeri.
   c) Si l'isolat diffère de 5 b) en étant positif à l'indole et au H_2S et produit de l'acide et du gaz en milieu TSI, on peut supposer qu'il s'agit d'E. tarda (Amandi et al. 1982).

A la figure 1, on donne le graphique de ces procédés; il présente des caractéristiques supplémentaires pour différencier les aéromonades motiles, Pseudomonas spp. et Vibrio spp.

Il faut effectuer des essais de confirmation pour toutes les bactéries à certifier qui ont été identifiées par supposition. Voir IX C 2 g pour les exceptions. Les tests sérologiques et biochimiques décrits en IX C 2 doivent utilisés à cette fin.

L'inspecteur sanitaire des poissons décidera s'il est nécessaire d'effectuer des essais pour confirmer la présence des agents pathogènes à déclarer. Pour les identifier, on devrait établir si l'agent pathogène provoque une moralité importante ou relève de la pathologie macroscopique.

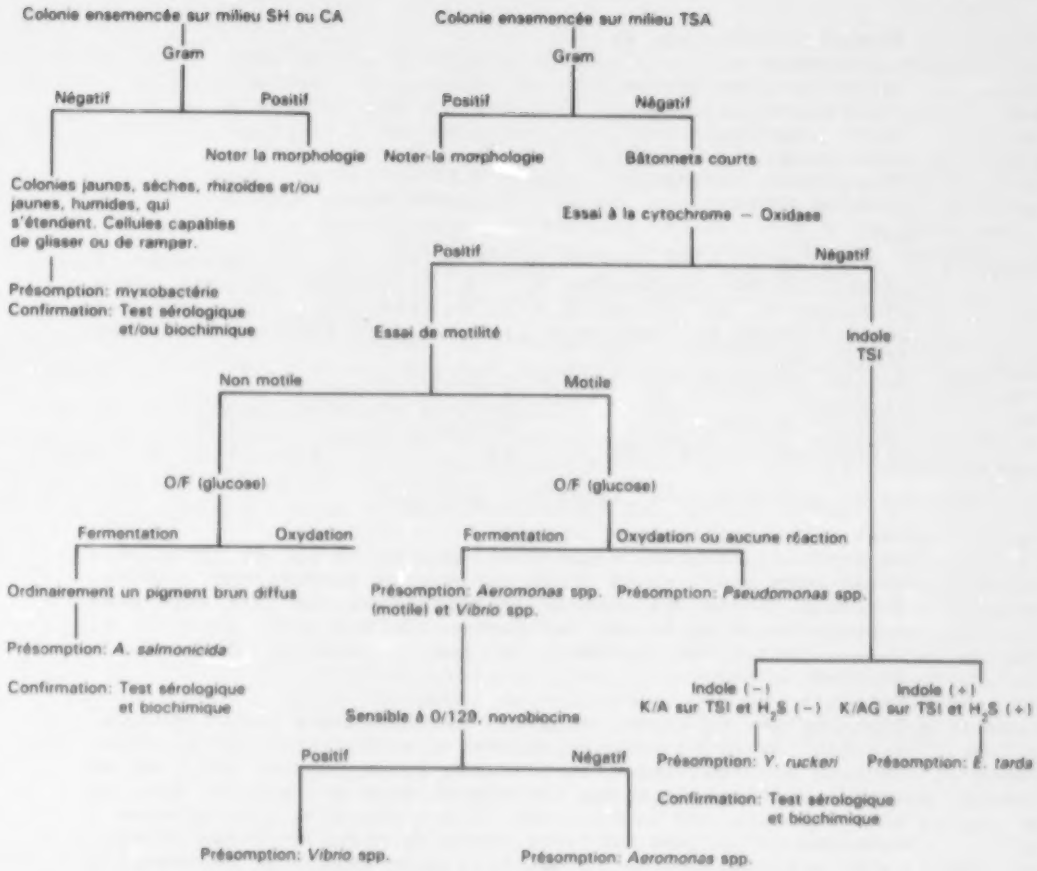

FIG. 1. Différentiation bactéries isolées à partir de poissons sur milieu TSA, SH ou CA.

C. MATERIEL[1] ET METHODES

1. Milieux de culture pour isolement

a) Gélose trypticase - soya (Difco)

b) Gélose SH (Shieh 1980)

Agar	1,0 %
Peptone	0,5 %
Extrait de levure	0,05 %
Sulfate de magnésium	0,03 %
Pyruvate de sodium	0,01 %
Phosphate monobasique de potassium	0,01 %

[1]Les produits spécifiés se sont avérés satisfaisants pour les objectifs poursuivis; cependant, cela n'implique pas que d'autres produits ne peuvent être tout aussi satisfaisants.

Phosphate dibasique de potassium	0,005 %
Bicarbonate de sodium	0,005 %
Chlorure de calcium	0,001 %
Acide citrique	0,001 %
Acétate de sodium	0,001 %
Chlorure de baryum	0,001 %
Sulfate ferreux	0,0001 %
pH	7,0

REMARQUE : Il s'agit d'un milieu de Shieh modifié. La néomycine (5 µg/mL) et la polymyxine B (10 unités/mL) peuvent être ajoutées à la gélose SH afin de faciliter l'isolement des myxobactéries en supprimant la croissance d'autres bactéries (Fijan 1969).

c) Gélose Cytophaga (Anacker et Ordal 1959)

Tryptone	0,05 %	Extrait de boeuf	0,02 %
Extrait de levure	0,05 %	Gélose	0,9 %
Acétate de sodium	0,02 %	pH	7,2-7,4

2. Milieux d'identification, réactifs, méthodes

a) Test à la cytochrome - oxydase
Au moyen d'une anse de platine, déposer un peu de la colonie bactérienne, provenant d'une culture à croissance active, sur une bande de papier imprégnée des réactifs chimiques appropriés. Bien étaler les germes; le test est positif si en moins d'une minute, le papier devient bleu clair (MacFaddin 1980).

b) Motilité
Examiner les cultures, en phase de croissance logarithmique, à l'état frais en suspension dans le bouillon trypticase-soya. Si les résultats laissent un doute, vérifier en inoculant en piqûres des tubes contenant le milieu utilisé pour l'étude de la motilité (Difco) ou le milieu glucose - motilité par piqûre profonde (GMD) (Walters et Plumb 1978).

c) Différentiation entre le métabolisme oxydatif et fermentaire des glucides.
Effectuer un test O/F (glucose) tel que décrit par MacFaddin (1980). Sinon, inoculer des tubes de culture GMD et interpréter les résultats tels que décrits par Walters et Plumb (1978).

d) Production d'indole
Effectuer le test pour rechercher la présence d'indole (MacFaddin 1980).

e) Milieu TSI (trois sucres + sulfate ferreux)
L'utilisation de la gélose TSI et l'interprétation des résultats de ce milieu de culture sont décrits par MacFaddin (1980).

f) Test d'agglutination sur lame pour recherche A. salmonicida (Rabb et al. 1964) et Y. ruckeri.
Le test d'agglutination se fait en émulsifiant une petite quantité de culture bactérienne dans une solution saline (NaCl à 0,9 %) sur une lame de verre propre. A l'aide d'une anse, on prélève de l'antisérum que l'on dépose près de la suspension bactérienne puis on réalise le mélange en

penchant et en faisant osciller la lame. Préparer les témoins positifs et négatifs appropriés. Le test d'agglutination positif est caractérisé par une agglutination rapide et macroscopique des cellules bactériennes du mélange étudié et du témoin positif (mais non de celle du témoin négatif). Une agglutination du témoin négatif annule l'essai. Un grand nombre de souches d'A. salmonicida s'autoagglutinent. Pour empêcher cela, placer la suspension dans l'eau bouillante pendant 15 minutes avant d'effectuer le test d'agglutination sur lame.

g) Tests de confirmation pour déceler la présence de R. salmoninarum

Si des signes cliniques ou l'examen de frottis de tissu rénal ayant subi une coloration de Gram portent à supposer la présence de R. salmoninarum, garder une partie du tissu rénal suspect et effectuer l'un des tests suivants. Si ce tissu rénal n'est pas disponible, la présomption de la présence de R. salmoninarum, telle que décrite précédemment (IX B 2), constitue un diagnostic confirmé.

(1) Test d'immunodiffusion (Chen et al. 1974)

Préparer les boîtes à immunodiffusion en versant dix mL de milieu composé d'agar Noble (1,0 %), de NaCl (0,9 %) et de thimerosol (0,01 %) dans une boîte de Pétri de 60 mm. Percer des puits de six mm de diamètre, six d'entre eux étant placés en cercle autour d'un puits central, pour que tous les puits soient distants de 6 mm. Verser 0,1 mL d'antisérum spécifique dans le puits central, et dans les puits périphériques ajouter séparément 0,1 mL d'une forte suspension de R. salmoninarum (témoin positif), de solution saline (témoin négatif), et un homogénat de rein à 50 % (échantillon étudié). Disposer le tout de façon à ce que les échantillons soient adjacents aux témoins positifs. Incuber les boîtes de pétri dans une chambre humide à 15°C pendant 48 h. Un test positif est caractérisé par une ligne de précipitation d'identité ou d'identité partielle entre l'échantillon et un témoin positif.

(2) Technique d'immunofluorescence directe (DFAT) (Bullock et al. 1980)

Préparer un frottis de rein sur une lame de verre propre, laisser sécher à l'air et fixer pendant 5 à 8 minutes dans l'acétone à 20°C. Ajouter sur la lame une à 2 gouttes de l'antisérum spécifique de R. salmoninarum, à la dilution optimale recommandée contenant un colorant fluorescent, la rhodamine (Difco), dilué au 1:150 - 1:200 et laisser réagir pendant 5 à 8 minutes à 20-25°C. Rincer la lame et laver pendant deux minutes dans une solution saline renfermant un tampon phosphate (pH 7.2) et faire sécher à l'air. Ajouter une goutte de liquide monté sur lame (pH 9,0) à la surface ensemencée, ajouter une lamelle et examiner un minimum de 25 champs sous l'huile à immersion en utilisant un microscope équipé d'une source de rayons ultraviolets. Un témoin positif doit

être préparé et coloré de la même façon. La présence de petits diplobacilles fluorescents de taille et de forme typique constitue un test positif.

(3) Technique d'immuno-fluorescence indirecte (IFAT) (Bullock et Stuckey 1975)
La technique d'immunofluorescence indirecte peut être utilisée à la place du test par immunodiffusion et du DFAT pour confirmer la présence de R. salmoninarum. Consulter l'ouvrage de référence pour la bonne procédure.

h) Confirmation biochimique d'A. salmonicida et Y. ruckeri
Les tests de confirmation d'isolats d'A. salmonicida et d'Y. ruckeri identifiés par présomption sont réalisés en utilisant des milieux classiques (Difco) tels que décrits par Edwards et Ewing (1972) ou le système diagnostique miniaturisé API-20E (Analytab Products Inc., Plainview, NY, U.S.A.) et en comparant les résultats avec ceux obtenus pour des cultures connues (témoin positif) de l'agent pathogène.

(1) Ensemencer par stries la culture bactérienne sur le milieu TSA et incuber à 20°C pendant 24 à 48 heures pour obtenir une culture pure.

(2) Préparer et inoculer séparément la culture bactérienne suspecte et la culture connue, selon les recommandations (Difco, Analytab Products Inc.). Lorsqu'on confirme par présomption des isolats identifiés d'Y. ruckeri, on recommande de prendre comme inoculum une suspension saline ayant une turbidité finale équivalant à celle d'une norme de turbidité McFarland #1).

(3) Incuber les milieux inoculés soumis à des tests biochimiques à 20°C pendant 24 à 72 heures. Ajouter les réactifs nécessaires et lire les résultats du test tel que recommandé (Difco, Analytab Products Inc.).

(4) Comparer les résultats obtenus pour l'isolat suspect à ceux des cultures bactériennes connues. Pour l'interprétation des profils biochimiques d'A. salmonicida, consulter les articles de Paterson (1974) et de Paterson et al. (1980); et pour Y. ruckeri, consulter l'article de Stevenson et Daly (1982).

i) Sensibilité à l'agent vibriostatique 0/129 et à l'antibiotique novobiocine
Le test se fait sur boîte de Pétri TSA en déposant un disque imprégné de 0/129 et un disque de novobiocine (5 µg) (Difco) sur le milieu dont la surface a été uniformément ensemencée avec l'organisme étudié. Après incubation à 20-22°C pendant de 16 à 24 h, si les organismes sont sensibles, une zone claire se forme autour du disque. Pour préparer les disques de 0/129, saturer des disques (6 mm) de papier-filtre Whatman, destinés à l'essai de sensibilité aux antibiotiques, avec une solution à 0,1 % de l'agent 0/129 dans l'acétone. Rejeter l'excédent de solution et faire sécher le disque à 37°C. Un disque témoin imprégné seulement d'acétone doit être inclus pour empêcher une réaction inhibitrice possible due à l'acétone. On peut obtenir

l'agent vibriostatique 0/129 (diamino-2,4 diisopropyl-6, 7 ptéridine) auprés de British Drug Houses au Canada et de Calbiochem aux Etats-Unis.

j) Test de motilité sur gélose (myxobactéries)

(1) Découper un bloc de gélose de 5 mm de côté sur lequel se trouve une colonie suspecte, le placer sur une lame et le recouvrir délicatement avec une lamelle.

(2) Examiner les bords de la colonie à fort grossissement et noter tout signe de motilité par glissement.

k) Tests sérologiques de confirmation

La confirmation de l'identité des bactéries par des tests sérologiques tels que les réactions d'agglutination sur lame, dans des tubes ou dans des petits puits doit être effectuée en utilisant des techniques classiques. Les sérums utilisés doivent être normalisés, préférablement absorbés et appropriés pour le but visé. Les organismes témoins positifs et négatifs doivent être inclus.

X TECHNIQUES DE DETECTION DES VIRUS

A. BUT

1. La présence de tout agent filtrable, dans les échantillons de poisson, qui présente une réplication intracellulaire dans l'une ou l'autre des cultures cellulaires déterminées doit être certifiée, qu'il soit possible ou non d'identifier ce virus avec les antisérums actuellement disponibles et que son pouvoir pathogène pour les salmonidés soit connu ou non. La méthodologie dépend de la détection d'effets cytopathologiques (CPE) dans les cultures cellulaires sensibles.

2. Toute lésion prolifération anormale (tumeurs) rencontrée doit être examinée par des méthodes histologiques, et les résultats de l'évaluation histopathologique indiqués.

B. TISSUS A ANALYSER

1. Alevins vésiculés et alevins : analyser au complet (lorsque présents, les sacs vitellins doivent être d'abord enlevés puis jetés).

2. Poisson dont la longueur moyenne à la fourche varie de 2 à 4 cm : enlever et jeter les têtes, mais garder les branchies; couper la queue juste avant l'anus. Hacher le reste des carcasses et analyser.

3. Poisson dont la longueur à la fourche varie entre 4 à 10 cm : enlever les branchies, puis éviscérer; analyser les viscères et les branchies combinés. Après enlèvement des branchies, l'éviscération se fait en étêtant d'abord le poisson, en incisant la paroi abdominale jusqu'à l'anus et finalement en coupant et grattant pour enlever les viscères (y compris le rein).

4. a) Poisson dont la longueur à la fourche est d'au moins 10 cm : analyser des mélanges de rein, rates, pancréas et caecum pylorique ainsi que de branchies. Le rapport entre les volumes relatifs de ces tissus devrait être de 3:1:1:1. Une partie du rein antérieur, médian et postérieur doit être incluse dans l'échantillon.

   b) Lorsque les poissons de cette taille sont des reproducteurs et que les liquides de reproduction doivent être utilisés, une quantité aussi grande que possible des échantillons de liquide de reproduction doit provenir des femelles. Pour un maximum de sensibilité, analyser individuellement les échantillons de liquides de reproduction.

C. COMBINAISON DES TISSUS

On peut combiner les tissus de cinq poissons au maximum pour former un échantillon. Mais, lors de la préparation des échantillons combinés, il ne faut jamais regrouper des poissons d'apparence saine (ou leurs tissus) avec des poissons moribonds (ou leurs tissus).

D. PREPARATION DES INOCULA

Les échantillons doivent être traités en-deça de 48 h après le prélèvement (voir VII A 1). Avant et pendant le traitement, les échantillons doivent être gardés réfrigérés ou sur de la glace, mais non congelés.

1. Tissus solides : Les tissus doivent être pesés et homogénéisés dans un volume minimal de solution saline équilibrée (SSE), comme celle de Earle ou de Hanks, dont le pH est à 7,6 - 7,8. IL existe 2 méthodes :
   a) Utiliser un Ten Broeck stérile ou homogénéisateur conçu pour permettre le refroidissement dans de la glace durant l'homogénéisation pour traiter de petits poissons ou de petites quantités de tissu. On doit faire attention pour empêcher une dissémination possible du virus dans l'air.
   b) Utiliser un mortier et un pilon stériles préalablement refroidis pour broyer les tissus avec une petite quantité de sable stérile (silice de 80-120 mailles) jusqu'à ce qu'il y aid formation d'une pâte lisse.
   Il n'est pas nécessaire de stériliser entre chaque utilisation le matériel utilisé pour homogénéiser des échantillons regroupés si ceux-ci proviennent d'un même lot.
   Après que les tissus ont été triturés, diluer chaque extrait d'échantillon pour obtenir une concentration finale de 2 % d'une suspension de tissus dans la SSE. Centrifuger les extraits pendant 15 minutes à 2500 x g à 4°C et filtrer aseptiquement le surnageant dilué à l'aide d'une membrane filtrante dont les pores ont 0,45 µm de diamètre. Pour éviter toute perte appréciable de virus par absorption sur le filtre, recueillir le plus grand volume possible de filtrat.

2. Echantillons liquides : Effectuer une dilution 1:2 avec le milieu minimum essentiel de Eagle (MME) froid, dont le pH est à 7,2-7,6. Centrifuger à 2500 x g pendant 15 minutes à 4°C puis décontaminer (voir X D 1).

E. ANALYSE

1. Cultures cellulaires

Pour l'analyse des virus, utiliser deux des trois lignées cellulaires continues suivantes : gonade de truite arc-en-ciel (RTG-2), embryon de saumon chinook (CHSE-214) et menés tête de

boule (FHM). La lignée FHM doit être utilisée dans les régions enzootiques du virus NHI.

Deux fois l'an ou avant chaque saison d'inspection, toutes les cultures cellulaires en stock doivent être analysées et trouvées exemptes de mycoplasme. Chaque type de cellule doit également être analysé pour rechercher sa sensibilité aux virus enzootiques à la région (c.-à-d. état, province ou bassin versant). Les cultures cellulaires donatrices utilisées pour préparer des couches monocellulaires pour la détection des virus ne doivent pas être âgés de plus de deux semaines.

Pour de plus amples informations sur les cultures cellulaires et la virologie des poissons, on peut se référer à McAllister (1979), Pilcher et Fryer (1980), Wolf et Quimby (1969) et Wolf (1970).

2. L'une ou l'autre des techniques suivantes peut maintenant être utilisée :

a) Inoculation de couches monocellulaires préformées.

(1) Préparer deux couches monocellulaires de chacune des deux lignées cellulaires pour chaque échantillon à analyser. Des boîtes de multiculture en plastique (puits d'un diamètre de 1,5 à 2,0 cm) peuvent être utilisées, fermées hermétiquement ou non (avec le tampon organique approprié incorporé dans le milieu).

(2) Pour chaque puits, utiliser 1,0 mL du MME de Eagle, à pH de 7,2 à 7,6, contenant les sels de Earle, de la glutamine et 10 % de sérum fétal de veau (SFV). Comme antibactérien, on peut utiliser par millilitre : 100 UI de pénicilline, 100 µg de streptomycine ou 50 µg de gentamicine. L'utilisation d'un fongistatique (par exemple 25 UI de nystatine par mL) est également permise.

(3) Incuber les cultures cellulaires entre 15 et 20°C; la température est fonction du moment où les cultures seront requises pour l'analyse. Au moment de l'inoculation, les couches monocellulaires doivent être confluentes à 70 ou 90 % et ne pas avoir plus de 48 h.

(4) Enlever le milieu de culture et laver les couches monocellulaires avec la SSE que l'on élimine avant d'inoculer 0,1 mL de l'échantillon filtré dans chaque puits.

(5) Incuber les cultures cellulaires inoculées à 15°C pendant 60 à 90 minutes. A tous les 20 minutes, secouer doucement les cultures pour étendre uniformément les inocula. Ajouter 1 mL du MME de Eagle contenant 2 % de SFV à chaque couche monocellulaire. Remarque : le

nouveau milieu doit être de même composition qu'en E 2 a (2) sauf pour la quantité moins grande de SFV et le pH final doit être compris entre 7,6 et 7,8.

(6) Incuber les cultures à 15°C.

b) Utilisation simultanée des cellules et de l'échantillon.

(1) Placer dans les puits de culture tiisulaire 1,0 mL de milieu (voir X E 2 a) contenant un nombre suffisant de cellules pour obtenir une couche monocellulaire continue à 70-90 %. Il est nécessaire de faire deux cultures de deux lignées cellulaires (voir X E 1) pour chaque échantillon.

(2) Ajouter immédiatement 0,1 mL d'échantillon filtré à chacune des cultures.

(3) Incuber les cultures à 15°C.

3. Témoins

Pour chaque lot de cultures cellulaires utilisées pour l'analyse, préparer en double des témoins négatifs. Les contrôles négatifs doivent être constitués de cultures inoculées suivant la méthode utilisée pour les analyses, cependant utiliser une solution saline équilibrée stérile à la place de l'échantillon.

4. Marche à suivre au cours de l'incubation

a) Examiner les cultures peu de temps après l'inoculation et après 24 h. Peu après, examiner les cultures au moins à tous les deux jours pour vérifier l'apparition d'effets cytopathologiques.

b) Un échantillon est considéré comme négatif si aucun ECP n'est apparu dans les cultures pendant les 14 à 21 jours qui suivent l'inoculation.

c) Si des ECP apparaissent dans une ou plusieurs des cultures inoculées avec les échantillons, on doit vérifier la présence d'un agent de réplication filtrable. Filtrer (diamètre des pores : 0,45 µm) le liquide de culture provenant des puits présentant des ECP, diluer le filtrat jusqu'à 10^{-1} et 10^{-3} dans la solution saline équilibrée et inoculer 0,1 mL de chacune des dilutions dans des nouvelles cultures, faites en double, de la même lignée cellulaire. Si des ECP sont encore observés, effectuer l'essai de neutralisation sérique.

F. ESSAI DE NEUTRALISATION SERIQUE

On peut supposer la présence de l'agent responsable des ECP peut être faite en se basant sur les observations cliniques lors de l'échantillonnage et sur le type d'ECP produit. L'identification se fait en neutralisant l'agent avec un antisérum spécifique. L'absence de neutralisation avec des antisérum de virus connus indiquera

habituellement la présence d'un virus jusque-là inconnu ou d'un sérotype atypique d'un virus connu de salmonidés.

1. Méthode

a) Employer un antisérum dilué pouvant neutraliser un volume égal d'une suspension qui contient 10^2 ou 10^3 $TCID_{50}$ par mL du virus homologue.

b) Filtrer le liquide d'une culture qui présente des ECP au moyen d'un filtre membrane dont les pores ont 0,45 µm de diamètre. Diluer le filtrat à 10^{-2} et 10^{-6} avec une SSE stérile.

c) (1) Mélanger 0,3 mL de l'antisérum dilué avec 0,3 mL de chacune des dilutions de l'échantillon.
(2) Mélanger 0,3 mL de sérum normal avec 0,3 mL de chacune des dilutions de l'échantillon.
(3) De la même manière, procéder à l'essai de neutralisation sérique sur des témoins positifs en employant l'antisérum homologue et le sérum normal.

d) Incuber les mélanges de la réaction à 15°C pendant 30-60 minutes puis inoculer 0,2 mL de chaque mélange dans deux cultures de la lignée cellulaire dans laquelle le virus a été isolé.

e) Incuber les cultures à 15°C et observer s'il y a production ou inhibition d'ECP. L'inhibition des ECP grâce à un antisérum donné (et non par un sérum normal) identifie le virus.

G. AUTRES METHODES DE CONFIRMATION

La méthodologie approuvée pour déceler des virus est basée sur l'isolement suivi de l'identification sérologique. Les méthodes permettant de confirmer l'identification des isolats de cultures cellulaires ne sont pas limités à l'essai de neutralisation sérique suggéré (X F). D'autres tests immunosérologiques valables peuvent être utilisés, y compris la microscopie aux anticorps fluorescents, les méthodes aux immunopéroxydases, les méthodes immuno-enzamétiques ELISA, le microtitrage et la micronneutralisation, la neutralisation sur plaque, la fixation du complément et la microscopie immunoélectronique.

XI TECHNIQUES DE DETECTION DE CERTAINS PARASITES

A. BUT

L'absence de deux agents pathogènes myxosporidiens soit être vérifée. Ces agents sont Myxosoma cerebralis et Ceratomyxa shasta. Il faut signaler la présence de tout autre parasite que l'inspecteur sanitaire des poissons considère comme important.

B. TECHNIQUES POUR DECELER MYXOSOMA CEREBRALIS

1. Les poissons doivent avoir au moins 120 jours et être, de préférence, frais. On peut utiliser des spécimens congelés, mais non conservés dans le formol. Toute la verrerie et l'équipement utilisés dans le traitement des échantillons doivent être nettoyés avec soin pour éviter la propagation de spores.

2. Décapiter le poisson et enlever la chair de la tête aprés l'avoir fait chauffer dans l'eau à 45-50°C jusqu'à coagulation du cerveau. Enlever le cerveau (et toute moelle épinière attachée) sans l'abimer. On évite ainsi que le tissu crânien ne soit contaminé par des spores de Myxobolus neurobius, autre parasite apparenté qui pourrait être confondu avec M. cerebralis.

3. On peut maintenant utiliser l'une ou l'autre des techniques suivantes :

   a) Méthode de la digestion*
      (1) Rassembler 100 g du tissu crânien obtenu et broyer finement. La petite taille des premiers fragments facilitera une digestion complète et rapide.
      (2) Placer dans un bécher et ajouter 25 mL de solution de pepsine fraîchement préparée (1,0 g de pepsine dissoute dans 10 mL de HCl à 0,5 %) pour chaque gramme de tissu macéré.
      (3) Bien mélanger, laisser reposer pendant deux minutes et examiner un échantillon provenant de la surface surnageant à un grossissement de 400-450X pour rechercher la présence de spores typiques au microscope à contraste de phase.
      (4) Si on ne détecte pas de spores, incuber le mélange à 35-40°C pendant 1-1.5 h en agitant doucement. Une suspension trouble, grisâtre, exempte de grosses

*La méthode indiquée ci-dessus est une variante de la méthode de digestion par la pepsine-trypsine de Markiw et Wolf (1974a et 1974b).

particules, devrait être présente à la fin de la période de digestion.

(5) Placer 50 ml de la suspension dans des tubes à centrifuger munis d'un bouchon fileté d'une capacité de 50 mL. Centrifuger à 1200 x g pendant 15 min à la température ambiante. Jeter le surnageant et remettre le culot en suspension dans 1,0 mL d'eau distillée. Le contenu de cinq tubes au maximum peut être combiné dans un échantillon. Examiner au microscope pour rechercher les spores comme précédemment.

(6) Si aucune spore n'est détectée, compléter le volume de chaque échantillon jusqu'à environ six mL avec de l'eau distillée. Déposer une couche du contenu de chaque tube sur trois mL d'une solution aqueuse de glucose à 55 % contenue dans un tube à centrifuger conique de 12 mL. Centrifuger à 1200 x g pendant 30 min à la température ambiante.

(7) Prélever un peu du culot à l'aide d'une pipette Pasteur et examiner au microscope au moins 25 champs par échantillon tel que mentionné dans XI B 3 a (3). L'observation de spores à n'importe quelle étape de la méthode constitue un résultat positif.

b) Méthode de la centrifugeuse à plancton (O'Grodnick 1975 et Prasher et al. 1971)

(1) Réunir 100 g de matière crânienne obtenue et faire macérer dans un mélangeur pendant cinq minutes avec de l'eau distillée. On peut utiliser jusqu'à 200 mL d'eau par 100 g de matière crânienne.

(2) Retirer la matière macérée et filtrer à vide à l'aide d'un fin treillis métallique (0,5 à 1,0 mm). Si le filtre s'obstrue, rincer avec de l'eau distillée pour le nettoyer, tout en laissant l'eau de rinçage se mélanger au filtrat. Ce procédé permet d'éliminer et de mettre de côté les gros morceaux tels que les grosses arêtes.

(3) Mettre le filtrat dans une ampoule à décanter placée de façon que le produit de la décantation tombe dans une centrifugeuse à plancton. Actionner la centrifugeuse à grande vitesse tout en y laissant lentement couler le filtrat.

(4) Centrifuger jusqu'à ce que toute l'eau ait été éliminée. Gratter le résidu qui s'est déposé sur les parois de la centrifugeuse, et le placer dans une petite bouteille. Ajouter cinq volumes d'eau distillée. Ne diluer pas au-delà d'un total de 30 mL. Fermer et agiter la bouteille jusqu'à ce que soit observée une suspension uniforme.

(5) Mettre une goutte de la suspension sur une lame ou sur un hématimètre si une quantification est nécessaire.

(6) Examiner au moins 25 champs de la lame à un grossissement de 450X afin de déceler la présence de spores de M. cerebralis au microscope à contraste de phase.

4. L'identification corroboré de spores de M. cerebralis doit être basée sur les caractères morophologiques donnés par Lom et Hoffman (1971).

C. TECHNIQUE POUR DECELER CERATOMYXA SHASTA

1. Pour les techniques qui suivent, les poissons doivent avoir au moins 120 jours; on peut utiliser des spécimens frais (de préférence) ou congelés.

2. Pour déceler les spores de C. shasta, on préfère utiliser des tissus d'intestin et de vésicule biliaire. Le liquide péritonéal peut également contenir des spores. Des lames microscopiques de tissu, de liquide et de substance purulente peuvent être préparées et examinées au besoin selon l'une des deux méthodes suivantes :

   a) Lames humides
   Préparer des lames humides en mélangeant doucement une quantité suffisante de tissu dans une ou deux gouttes de solution saline (0,9 % de NaCl) sur une lame microscopique ordinaire pour obtenir une suspension raisonnablement diluée, couvrir d'une lamelle et examiner à un grossissement de 400 à 450X au microscope à contraste de phase.

   b) Frottis séchés
   Faire un frottis du tissu à examiner sur une lame microscopique ordinaire, laisser sécher à l'air, colorer pendant 30 à 60 secondes avec du bleu de méthylène de Loeffler (dissoudre 0,3 g de chlorure de bleu de méthylène dans 30 mL d'éthanol à 95 % et ajouter 100 mL de KOH aqueux à 0,1 %), rincer à l'eau et laisser sécher à l'air). Ajouter une goutte d'huile à immersion ou d'eau à chaque frottis, recouvrir d'une lamelle et examiner un grossissement de 400 à 450X pour y déceler la présence de spores. Les capsules et les filaments allongés polaires se colorent en bleu foncé tandis que le sporoplasme se colore en bleu pâle.

3. Pour les poissons dont la longueur à la fourche est inférieure à 7,5 cm, le tissu à examiner peut être prélevé des intestins. De plus, s'il y a des lésions nodulaires dans un des tissus ou s'il y a présence de liquide ascitique, préparer des frottis ou des lames humides de ce tissu ou de ce liquide.

4. Pour les poissons dont la longueur à la fourche est supérieure à 7,5 cm, ouvrir la cavité générale et prélever un peu de tissu en grattant la paroi interne de l'intestin grêle ou de la vésicule biliaire. Si l'on observe des lésions nodulaires sur un tissu ou à l'intérieur, en particulier sur les caecums pyloriques, ou si on trouve toute accumulation normale de liquide, on doit les examiner pour y déceler des spores de C. shasta.

5. Pour chaque frottis ou chaque lame humide, il faut examiner au moins 25 champs microscopiques pour y déceler la présence de spores de C. shasta.

6. L'identification des spores de C. shasta doit être basée sur les caractères diagnostiques donnés par Johnson et al. (1979). Des stades de C. shasta précédant la formation des spores peuvent être trouvés sans qu'il y ait de spores qui les accompagnent; ces stades ne permettent pas de diagnostiquer l'organisme et leur présence indique qu'il faut prélever d'autres échantillons et faire d'autres examens pour déceler des spores caractéristiques (Noble 1950; Yamamoto et Sanders 1979).

On trouvera des renseignements supplémentaires sur l'identification des agents pathogènes des poissons dans McDaniel (1979).

XII TECHNIQUES DE DESINFECTION DES OEUFS

Ce n'est qu'après le gonflement d'eau qui suit la fécondation ou au tout début de la formation de l'embryon que les oeufs de Salmonidés sont le plus efficacement désinfectés en surface. On trouvera ci-après la méthode proposée pour désinfecter les oeufs en surface qui utilise des iodophores. Les iodophores servant à la désinfection sont habituellement composés de providone ou sont des complexes polyalcooliques d'iode dans lesquels l'iode solubilisé confère son activité germicide à large spectre mais n'est pas aussi corrosif ou irritant que sous sa forme élémentaire. Un certain nombre de désinfectants[1] de ce type sont disponibles dand le commerce en Amérique du Nord; on trouve entre autres les produits suivants : Ovadine®, Bridine®, Betadine®, Actomar K30®, Wescodyne® et Argentyne®. La plupart contiennent une concentration d'iode actif de 1-2 %.

A. PREPARATION DU DESINFECTANT

1. Diluer le désinfectant à base d'iode pour obtenir une solution contenant 100 parties par million (ppm) d'iode actif. Le désinfectant doit être préparé dans de l'eau à faible teneur en matiéres organiques pour minimiser la perte d'iode libre. Utiliser un bac en plastique, en verre, en acier inoxydable ou en fibre de verre pour préparer et garder la solution.

2. Vérifier le pH du désinfectant dilué et, si nécessaire, adjuster à 6,5-7,5 en ajoutant du bicarbonate de sodium aqueux à 8 % (bicarbonate de soude).

B. TECHNIQUE DE DESINFECTION

1. Utiliser une solution récente de désinfectant dilué.

2. Pour éviter le choc de la température, ajuster la solution du désinfectant à la même température que la température ultérieure d'incubation des oeufs.

3. Dans le cas d'oeufs récemment fécondés, les laisser se gonfler d'eau une heure avant la désinfection.

4. Plonger dans le désinfectant les oeufs récemment gonflés dans l'eau ou les jeunes embryons pendant 10 minutes.

5. Traiter environ 2000 oeufs par litre avant de jeter le désinfectant.

---

[1]Les produits mentionnés se sont révélés satisfaisants pour les objectifs poursuivis; cependant cela ne signifie pas que d'autres produits ne peuvent être tout aussi satisfaisants.

6. Rincer les oeufs à fond dans de l'eau non contaminée après désinfection.

7. Eviter tout contact avec l'appareillage, l'eau ou le personnel pour empêcher la contamination des oeufs désinfectés.

Des iodophores dilués peuvent également être utilisés pour désinfecter les surfaces de travail, les utensiles, les filets et d'autres appareils utilisés au cours du prélèvement des oeufs, mais il faut rincer à fond dans une eau propre, non contaminée après la désinfection.

BIBLIOGRAPHIE

AMANDI, A., S.F. HIU, J.S. ROHOVEC and J.L. FRYER. 1982. Isolation and characterization of Edwardsiella tarda from fall chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Appl. Envir. Microbiol. 43 : 1380-1384.

ANACKER, R.L., and E.J. ORDAL. 1959. Studies on the myxobacterium Chondrococcus columnaris. 1. Seriological typing. J. Bacteriol. 78 : 25-32.

BULLOCK, G.L., R.R. GRIFFIN and H.M. STUCKEY. 1980. Detection of Corynebacterium salmoninus by direct fluorescent antibody test. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37 : 719-721.

BULLOCK, G.L. and H.M. STUCKEY. 1975. Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 32 : 2224-2227.

CHEN, P.K., G.L. BULLOCK, H.M. STUCKEY, and A.C. BULLOCK. 1974. Serological diagnosis of corynebacterial kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 31 : 1939-1940.

EDWARDS, P.R. and W.H. EWING. 1972. Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. 362 p.

EVELYN, T.P.T. 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen Aeromonas salmonicida isolated from a marine host, the sablefish (Anoplopoma fimbria) and from two species of cultured Pacific salmon. J. Fish. Res. Board Can. 28 : 1629-1634.

FIJAN, N.N. 1969. Antibiotic additives for the isolation of Chondrococcus columnaris from fish. Appl. Micro. 17 : 333-334.

GRIFFIN, P.J., S.F. SNIESZKO, and S.B. FRIDDLE. 1952. A more comprehensive description of Bacterium salmonicida. Trans. Am. Fish. Soc. 82 : 129-138.

JOHNSON, K.A., J.E. SANDERS, and J.L. FRYER. 1979. Ceratomyxa shasta in salmonids. U.S. Fish and Wild. Serv., Fish Dis. Leafl. No. 58, Washington, DC. 11 p.

LOM, J. and G.L. HOFFMAN. 1971. Morphology of the spores of Myxosoma cerebralis and M. cartilaginis (Hoffman, Putz, and Dunbar 1965). J. Parasitol. 57(6) : 1302-1308.

MacFADDIN, J.F. 1980. Biochemical tests for the identification of medical bacteria, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 527 p.

MARKIW, M.E., and K. WOLF. 1974a. Myxosoma cerebralis : Isolation and concentration from fish skeletal elements - sequential enzymatic digestions and purification by differential centrifugation. J. Fish. Res. Board Can. 31 : 15-20.

1974b. Myxosoma cerebralis : Comparative sensitivity of spore detection methods. J. Fish. Res. Board Can. 31 : 1597-1600.

McALLISTER, P.E. 1979. Fish viruses and viral infections, In : Comprehensive Virology, Vol. 14, Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R. eds., Plenum Press, New York and London. 401-470.

McDANIEL, D. (ed.). 1979. Fish health bluebook : procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish. Health Sec., Am. Fish. Soc., Bethesda, MD. 118 p.

NOBLE, E.R. 1950. On a myxosporidian (protozoan) parasite of California trout. J. Parasitol 36 : 457-460.

O'GRODNICK, J.J. 1975. Whirling disease Myxosoma cerebralis : Spore concentration using the continuous plankton centrifuge. J. Wildl. Dis. 11 : 54-57.

OSSIANDER, F.J., and G. WEDEMEYER. 1973. Computer program for sample sizes required to determine disease incidence in fish populations. J. Fish. Res. Board Can. 30 : 1383-1384.

PATERSON, W.D. 1974. Biochemical and serological differentiation of several pigment producing aeromonads. J. Fish. Res. Board Can. 31 : 1259-1261.

PATERSON, W.D., D. DOUEY, and D. DESAUTELS. 1980. Isolation and identification of an atypical Aeromonas salmonicida strain causing epizootic losses among Atlantic salmon (Salmo salar) reared in a Nova Scotian hatchery. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37 : 2236-2241.

PILCHER, K.S., and J.L. FRYER. 1980. The viral diseases of fish : A review through 1978 Part 1 : Diseases of proven viral etiology. CRC Critical Reviews in Microb. 7(4) : 287-363.

PRASHER, J.B., W.M. TIDD, and R.A. TUBB. 1971. Techniques for extracting and quantitatively studying the spore stage of the protozoan parasite Myxosoma cerebralis. Prog. Fish-Cult. 33 : 193-196.

RABB, L., J.W. CORNICK, and L.A. McDERMOTT. 1964. A microscopic slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish. Prog. Fish-Cult. 26 : 118-119.

SANDERS, J.E. and J.L. FRYER. 1980. Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 30(2) : 496-502.

SHIEH, H.S. 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, Flexibacter columnaris. Microbios Letters, 13 : 129-133.

STEVENSON, R.M.W. and J.G. DALY. 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of Yersinia ruckeri. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39 : 870-876.

TAYLOR, E.L., S.J. COLI, and D.R. JUNELL. 1973. Attempts to control whirling disease by continuous drug feeding. J. Wildl. Dis. 9 : 320-325.

WOLF, K. 1970. Guidelines for virological examination of fishes, In : A symposium on diseases of fish and shellfish. Am. Fish. Soc., Spec. Publ. No. 5, Washington, DC. 327-340.

WOLF, K. and M.C. QUIMBY. 1969. Fish cell and tissue culture, In : Fish Physiol. Vol. 3, Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds. Academic Press, New York, NY. 253-305.

YAMAMOTO, T. and J.E. SANDERS. 1979. Light and electron microscopic observations of sporogenesis in the myxosporidium, Ceratomyxa shasta (Noble 1950). J. Fish Dis. 2 : 411-428.

ANNEXE 1 REGISTRE NATIONAL D'ICHTYOPATHOLOGIE

Le Registre national d'ichtyopathologie est une banque de données servant à recueillir et à distribuer l'information concernant les maladies des poissons au Canada. Les rapports de laboratoire sur l'état physiologique des poissons établis à partir de tous les examens faits au Canada pour déceler les maladies, non seulement les analyses faites aux fins de délivrance de certificats, mais également les examens faits dans le cadre de programmes d'échantillonnage périodiques réguliers, devraient être soumis régulièrement au responsable du Registre par les inspecteurs sanitaires du poisson.

Le responsable du Registre national d'ichtyopathologie se charge :

1. de maintenir une étroite surveillance de la répartition géographique et de la fréquence des maladies du poisson au Canada et d'identifier les urgences en cette matière;

2. d'agir à titre de centre de coordination dans les cas d'urgences nationales touchant à la santé des poissons;

3. de fournir des rapports, des analyses et des évaluations périodiques sur l'état pathologique des poissons au Canada;

4. de fournir les antécédants sanitaires des sources de poissons vivants et d'oeufs;

5. de maintenir et de fournir des listes des établissements canadiens autorisés à faire l'élevage du poisson;

6. de maintenir et de fournir des listes des inspecteurs sanitaires des poissons et des agents locaux de protection de la santé du poisson autorisés par le ministre; et

7. de maintenir et de fournir des listes des représentants officiels autorisés par le gouvernement canadien à délivrer des certificats dans les pays étrangers qui exportent du poisson et des oeufs au Canada.

L'adresse du Registre national est la suivante :

Le Registre national d'ichtyopathologie
Ministère des Pêches et des Océans
Ottawa (Ontario), Canada
K1A 0E6 (Tel. : 613-990-0276; Télex 0534228)

ANNEXE 2 ADMINISTRATION REGIONALE

Le Règlement est administré et mis en application par divers organismes provinciaux et régionaux. Dans certaines régions, les organismes provinciaux sont impliqués, alors que dans d'autres, ce sont des organismes fédéraux. Les adresses sont les suivantes :

1. Administrations des pêches provinciales

Alberta
Fish and Wildlife Division
Department of Energy and Natural Resources
9915, 108 Street
Edmonton (Alberta)
T5K 2C9 (Tél. : 403-427-6730)

Colombie-Britannique
Fish and Wildlife
Ministry of Environment
780 Blanshard Street
Victoria (C.-B.)
V8V 1X5 (Tél. : 604-387-1961)

Manitoba
Services de mise en valeur des pêches
Direction des pêches
Ministère des ressources naturelles
1495, rue St. James
Winnipeg (Manitoba)
R3G 0W9 (Tél. : 204-994-7792; Télex 07-587740)

Ontario
Fisheries Branch
Ontario Ministry of Natural Resources
Queen's Park
99 Wellesley St. West
Toronto (Ont.)
M7A 1W3 (Tél. : 416-965-7886; Télex 06-219701)

Québec
Service de pisciculture
Ministère du Loisir, de la chasse et de la pêche
150, boul. St-Cyrille
Québec (Qué.)
G1R 4Y3 (Tél. : 418-643-4664/7; Télex 051-3994)

Saskatchewan
Superintendent of Fisheries
Fisheries Branch
Department of Parks and Renewable Resources
Box 3003
Prince Albert (Sask.)
S6V 6G1 (Tél. : 306-922-9887)

2. Bureaux régionaux de l'administration fédérale des pêches

Manitoba
Direction de l'inspection et de la technologie
Ministère des Pêches et des Océans
153, av. Lombard
Winnipeg (Man.)
R3B 0T3 (Tél. : 204-949-4060; Télex 075-7419)

Terre-Neuve
Bureau régional de Terre-Neuve
Direction de la recherche sur les pêches
Ministère des Pêches et des Océans
C.P. 5667
St. John's (Terre-Neuve)
A1C 5X1 (Tél. : 709-772-2194; Télex 016-4698)

Territoires du Nord-Ouest
Ministère des Pêches et des Océans
C.P. 1008
Hay River (T.N.-O.) (Tél. : 403-874-2331; Télex 034-4324)

Nouveau-Brunswick, Nouvelle-Écosse, Île-du-Prince-Édouard
Bureau régional de Scotia-Fundy
Ministère des Pêches et des Océans
C.P. 550
Halifax (N.-É.)
B3J 2S7 (Tél. : 902-426-2581; Télex 019-21819)

Bureau régional du Golfe
Ministère des Pêches et des Océans
C.P. 5030
Moncton (N.-B.)
E1C 9B6 (Tél. : 506-758-9044; Télex 0142-607)

Ontario
Services relatifs aux pêches et à l'industrie
Ministère des Pêches et des Océans
590, rue Keele, pièce 410
Toronto (Ontario)
M6N 3E3 (Tél. : 416-763-1161; Télex 06-22790)

Québec
Direction de l'inspection et de la technologie
Ministère des Pêches et des Océans
1001 Pierre Dupuy
Laboratoire du capitaine Bernier
Longueuil (Qué.)
J4K 1A1 (Tél. : 514-283-4967)

Saskatchewan
Responsable de district
Ministère des Pêches et des Océans
Edifice de l'immigration
Prince Albert (Sask.)
S6V 1E8 (Tél. : 306-764-6424; Télex 074-29217)

Yukon et régions maritimes de la Colombie-Britannique
Station biologique du Pacifique
Ministère des Pêches et des Océans
Nanaïmo, (C.-B.)
V9R 5K6 (Tél. : 604-756-7000; Télex 044-6128)

ANNEXE 3 COMPETENCE DES INSPECTEURS SANITAIRES DES POISSONS

Les conséquences de l'introduction d'une maladie infectieuse des poissons sont très importantes, aussi l'inspecteur sanitaire des poissons doit-il avoir une bonne connaissance dans le domaine de la santé des poissons ainsi que des méthodes de diagnostic. Les critères suivants représentent les exigences minimales nécessaires pour être accepté par le gouvernement canadien co inspecteur sanitaire des poissons.

A. INSTRUCTION ET EXPERIENCE

1. Baccalauréat, ou l'équivalent, dans tout domaine des pêches ou des sciences biologiques et deux années d'expérience en ichtyopathologie, comprenant une expérience des techniques bactériologiques, virologiques et parasitologiques.

2. Maîtrise ou doctorat en médecine vétérinaire, ou l'équivalent, et une bonne formation en bactériologie, virologie et parasitologie ainsi qu'un an d'expérience en ichtyopathologie.

B. LABORATOIRE

Le futur inspecteur doit disposer d'un laboratoire approprié pour l'évaluation microbiologique et parasitologique des échantillons.

C. FORMALITES A REMPLIR

Pour que la demande d'autorisation comme inspecteur sanitaire des poissons soit étudiée, un candidat doit soumettre au Registre national d'ichtyopathologie un curriculum vitae, trois spécimens de signature ainsi qu'une description des installations et de l'équipement de laboratoire disponibles.

ANNEXE 4

Certificat de santé du poisson

Gouvernement du Canada
Pêches et Océans

Government of Canada
Fisheries and Oceans

CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON

Date d'expiration du certificat
J M A

CERTIFICAT D'INSPECTION DE LA SOURCE

Nom de l'expéditeur	Adresse	N° de téléphone

Je, _____ (Nom en lettres moulées), inspecteur sanitaire des poissons approuvé par le Ministre des Pêches et des Océans du Canada, déclare que la source nommée ci-dessus a été inspectée selon les méthodes approuvées par le Ministre et qu'aucun signe des maladies ou agents pathogènes indiqués ☐ à l'annexe II pour l'expédition des poissons vivants ou ☐ à l'annexe III pour l'expédition de poissons morts n'y a été trouvé tel que prescrit dans le Règlement sur la protection de la santé des poissons en vertu de la Loi canadienne sur les pêcheries.

Les agents pathogènes à déclarer suivants (Annexe IV) et(ou) autres organismes pathogènes ont été trouvés:

_____

Dates des quatre dernières inspections satisfaisantes:	J M A	J M A	J M A	J M A

Date d'émission | Signature et adresse de l'inspecteur | N° de téléphone

ENVOI

Ville et pays d'origine	Transporteur	N° de connaissement	Date J M A

Port d'entrée prévu au Canada (ville et province)	Date J M A

Date | Nom et adresse du destinataire | N° de téléphone

DÉCLARATION D'EXPORTATION

Je, _____ (Nom en lettres moulées), ☐ propriétaire ☐ directeur de l'installation susmentionnée dont la dernière inspection remonte au _____ Date, déclare que, à ma connaissance, aucun agent pathogène énuméré à l'annexe II du Règlement sur la protection de la santé des poissons (RPSP) n'a été décelé conformément aux procédures exposées dans le guide de procédures du RPSP dans cette installation depuis la dernière inspection, qu'aucun poisson ou œuf de poisson provenant d'une source non certifiée n'a été introduit dans cette installation, que l'envoi proviendra uniquement de l'installation en question et que les œufs expédiés subiront une désinfection en surface avant de quitter la source.

Je, _____ (Nom en lettres moulées), expéditeur d'œufs obtenus de reproducteurs sauvages, déclare que les œufs subiront une désinfection en surface et qu'ils proviennent uniquement de la source inspectée.

L'envoi se compose de:

_____ kg ☐ Vivants ☐ Œufs _____ Espèce

_____ Nombre ☐ Morts ☐ Poissons _____ Espèce

Date | Signature et adresse du propriétaire, du directeur ou de l'expéditeur | N° de téléphone

FP-0867 f (02/84)

ANNEXE 5

Rapport de laboratoire

sur l'état physiologique des poissons

Gouvernement du Canada
Pêches et Océans

Government of Canada
Fisheries and Oceans

Date d'inspection	J	M	A
Annexe du RPSP			
Enquêteur			
Laboratoire			

RAPPORT DE LABORATOIRE SUR L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES POISSONS

A. Emplacement

1. Nom et adresse de l'installation	2. Type d'installation	
	3. Plan d'eau naturel (préciser)	4. Province

B. Poissons

Espèce	Poisson/œufs	Âge/stade	Nombre retenu	Nombre examiné

Stocks introduits depuis la dernière inspection en vertu du RPSP

Espèce	Âge/stade	Nombre	Source

C. Eau

1. ☐ Eau municipale	2. ☐ Lac	3. ☐ Cours d'eau	4. ☐ Source encaissée
5. ☐ Source à découvert	6. ☐ Puits	7. ☐ Puits profond	8. ☐ Eau saumâtre
9. ☐ Eau salée	10. ☐ Désinfection des affluents	11. ☐ Désinfection des effluents	
Dans quoi l'effluent se déverse-t-il?		Nom du bassin versant	

D. Maladies

1. ☐ Aucun agent pathogène décelé
2. ☐ Agent pathogène de l'annexe II décelé

Indiquez la prédominance en marquant: a. porteurs, b. symptômes cliniques ou c. épizootique, dans les rectangles ci-dessous.

☐ *A. salmonicida* (furunculose)	☐ Virus VHS	☐ *M. cerebralis*
☐ Bactérie KD *R. salmoninarum*	☐ Virus IHN	☐ *C. shasta*
☐ Bactérie RM *Y. ruckeri*	☐ Virus IPN	
	☐ Autres agents de réplication	

3. Autres agents pathogènes ou tumeurs décelés (préciser)

Remarques supplémentaires (par ex. désinfection des installations et produits chimiques utilisés; désinfection des œufs et produits chimiques utilisés; médicaments et vaccins utilisés)

Date d'émission

Signature de l'inspecteur sanitaire des poissons

FP-0866 f (02/84)